

Departamento de Bioquímica

Facultad de Medicina

Universidad Autónoma de Madrid

**Efectos bioquímicos y biológicos de los
mediadores inflamatorios PGA_1 y óxido nítrico
sobre las proteínas Ras**

Andrea Pérez Rodríguez

Licenciada en Biología

Directores de tesis

José María Rojas Cabañeros, José Luis Oliva Martínez

Instituto de Salud Carlos III

Centro Nacional de Microbiología

Unidad de Biología Celular

Majadahonda, Madrid.

Los doctores José María Rojas Cabañeros y José Luis Oliva Martínez, del Instituto de Salud Carlos III, dentro de la Unidad de Biología Celular del Área de Biología Celular y del Desarrollo, del Centro Nacional de Microbiología

CERTIFICAN: que D^a. Andrea Pérez Rodríguez, licenciada en Biología por la Universidad de Vigo, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo de investigación titulado:

“Efectos bioquímicos y biológicos de los mediadores inflamatorios PGA_1 y óxido nítrico sobre las proteínas Ras”

En nuestra opinión, éste trabajo de investigación reúne todas las condiciones requeridas por la legislación vigente, así como la originalidad y calidad científica necesarias, para poder ser presentado y defendido con el fin de optar al grado de Doctora por la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que conste donde proceda, firmo el presente certificado en Madrid, a 14 de Diciembre de 2009.

José María Rojas Cabañeros

Investigador Titular de OPI

José Luis Oliva Martínez

Investigador del Sistema Nacional de Salud

Alberto Muñoz Terol

Profesor honorario del departamento de bioquímica, UAM



Esta tesis ha sido posible gracias al Instituto de Salud Carlos III, en donde se ha desarrollado la mayoría del trabajo, y a las entidades que me han contratado; La Caixa y Comunidad de Madrid, a los que quiero agradecer la oportunidad para hacer esta tesis.

Durante estos cinco años, han sido muchas las personas que me han enseñado, dirigido y acompañado, y a las cuales quiero agradecerle todo lo que han hecho.

Quiero agradecerle, Alberto, que hayas sido mi tutor y me hayas facilitado tanto las cosas.

José María; gracias por haberme admitido en el laboratorio.

Pepe, gracias por ser mi codirector y mi compañero. Gracias porque desde que llegaste al laboratorio "re-inyectaste" en mí la curiosidad y la ilusión por los experimentos. Gracias por las discusiones científicas, por tu alegría conmigo y con el laboratorio. Gracias por tu apoyo en los momentos más bajos, la energía en todo momento, y por la confianza que siempre has tenido en mí. Gracias por considerarme científica, y por hacerme responsable de mi tesis.

He tenido la oportunidad de hacer una estancia en dos laboratorios en los que he aprendido mucho de ciencia. Quiero agradecerle a Marian y a su laboratorio la paciencia, el tiempo invertido en mí, y el haber hecho mi estancia en vuestro laboratorio tan agradable y acogedora. Gracias a Juan Serrador y su laboratorio por la crítica científica. Gracias Juan por estar siempre disponible y ser tan cercano.

También hemos colaborado con grupos científicos con los que hemos intercambiado ideas e hipótesis. Gracias Dolores Pérez Sala y Federico Gago por vuestra colaboración y discusión científica.

La ciencia, empecé a disfrutarla en Vigo, en el laboratorio de Inmunología de la Universidad. África; gracias por el apoyo, ilusión, fuerza y cercanía que me transmites siempre. Silvia, Susana y Helena: ha sido una suerte compartir laboratorio y cenas con vosotras.

Durante esta tesis, he contado con un laboratorio con el que he compartido mucho, y al que también tengo mucho que agradecer. Natalia, gracias porque me has apoyado siempre, porque al principio fue difícil y has estado de mi lado, has trabajado conmigo para sacar las cosas adelante. Gracias porque has sido mi compañera, por lo que nos hemos reído, por las conversaciones de los lugares de Madrid, por tu fuerza, valentía y comprensión siempre que los he necesitado. Gracias Carlota, porque

contigo Madrid empezó a ser diferente. Gon, ¡de verdad que eres casi infinito!; gracias por los mediodías, por tu humor peculiar, por el baloncesto en Salamanca, y por las conversaciones de experimentos. Silvia; gracias por todo, es una suerte haberte conocido. Con Iván y la peque, hacemos un equipo genial!. Diana; ¡eres el sol del laboratorio! gracias por tu alegría y conversación. Gracias a “las gusaneras”; Mapi, Ana y Encarni. Gracias por vuestra tranquilidad y cariño, por los desayunos y comidas en nuestra salita. ¡¡¡Agustín!!! gracias por Las Rozas, por los mediodías en la cafetería, por las noches en Madrid, por tu sonrisa de compañero y por tu apoyo. Berta; gracias por tu paciencia, comprensión y cariño. Gracias por la dedicación al proyecto, la ayuda con la tesis, y por ser mi compañera. Gracias Teresa por tu cariño y paciencia. Laura; ¡¡viva tu alegría!! Gracias por el cariño e implicación conmigo. Espero que podamos jugar ese partido al pádel! Jose Luis; ¡una caña sin alcohol y un tinto de verano! gracias por las rutas y el terraceo.

Las cañas, las cenas de becarios, los mediodías, las risas, el cariño... gracias Pachi, Eliana, Ester, Nuria y Javi: gracias porque el Carlos III es diferente con vosotros. Gracias María, Carmen, Concha, Ramón y Víctor (¡los Cecillos!) por los mediodías llenos de conversaciones. Gracias Raquel por ser tan estupenda y llenarme de alegría y cariño.

Gracias a “los chicos”; gracias Nacho, Raúl y Sole. Gracias por todo; por las risas, el cariño, la paciencia, los mediodías y los cafés, las hamburguesas, la simplicidad, el etanol... Espero que algún día hagamos ese viaje juntos.

Inma, de verdad, que vas monísima siempre! Gracias por los viajes en los “L”, por tu complicidad, y... gracias por la citometría; sin ti no habría sido posible! Gracias Toraño por las canciones y el buen humor, y Merche; gracias por la energía y organización.

Celia y Lucía; gracias por el principio y por retomar ahora con tanto cariño e implicación. Carmen, gracias por todo lo que hemos vivido. Nuria; hiciste de San Bernardino nuestra casa. Gracias Mariví por los téis y los chakras. Ana, gracias por tu sonrisa. Tasio, Jose, Enrique y Carlos; gracias por vuestro buen rollo! Breo, gracias por el piso de Ercilla, por las fotos, las conversaciones, el cariño y apoyo. Gracias al resto de SanBer; Lorena, Ana, Tatiana y David...lo bien que lo pasamos, el singstar, y las cenas! ¡Una saeta a San Bernardino!

Gracias a mis nuevas compañeras de piso; Estefanie, Estelle, Desy y Ashley.

Gracias a mi familia. Gracias papá y mamá; gracias por el apoyo incondicional siempre, por los viajes a Madrid, por los fines de semana en Vigo... a mis hermanos; Antonio, gracias por tu cariño, comprensión, y por las conversaciones que podrían ser

interminables ... gracias Alberto por tu cariño y seguridad, por las comidas en Vigo, y los fines de semana en Madrid. Gracias Mónica y Rebeca porque sois estupendas. ¡¡Nos queda mucho tiempo por delante para disfrutarlo juntos!!.

Gracias al resto de mi familia. Gracias a mis dos soles de tías, Sara y María; gracias porque habéis estado siempre a mi lado... y por los tupperts del principio! Gracias Luci y Nisio; gracias por todo, por vuestro saber hacer, por vuestro cariño incondicional... Gracias al resto de mi familia; a los Rodríguez por su alegría, por su buen rollo, porque cuando nos reunimos es maravilloso y que ¡viva la cena de las mujeres!. Gracias Daniel y Rosana por el tiempo en Vigo; es genial estar con vosotros. Gracias a las Pérez por lo graciosas, a mi abuela por seguir luchando, a Isaac y Jose por el cariño. Gracias a mis primos de Vigo, Madrid... y Munich!

Gracias a mis amigos de Vigo; gracias Lara, Pablo, María, Paula y Ana. Seréis siempre mis amigos.

Gracias especialmente a Magoya, Javier, Genma, Vicente y Gloria; esta tesis está dedicada a vosotros. Gracias por vuestra implicación, dedicación y cariño. Gracias por enseñarme a encontrar mi camino.

Gracias a todos, gracias por haberme acompañado.

Resumen

En esta tesis analizamos la activación de las proteínas Ras por dos factores sintetizados en procesos inflamatorios; la prostaglandina ciclopentenona PGA_1 y el óxido nítrico. Nuestros resultados indican que PGA_1 se une a las cisteínas 118 y 184 de H-Ras; activa a todas las isoformas de Ras, y sugieren que no es necesario GTP (experimentos realizados *in vitro*) ni factores intercambiadores de nucleótido (GEFs), a diferencia del mecanismo clásico de activación de Ras. La activación de Ras por PGA_1 ocurre principalmente en retículo endoplásmico y aparato de Golgi, e induce la activación de ERK. Los efectos biológicos de la activación de Ras por PGA_1 dependen del contexto celular. Así, la estimulación de H- y N- Ras por PGA_1 , origina apoptosis en fibroblastos, mientras que la activación por PGA_1 , en presencia de NGF, incrementa la diferenciación en células PC12. Por otro lado, el óxido nítrico activa a las tres isoformas de Ras y la estimulación ocurre principalmente en regiones de endomembranas, al igual que PGA_1 . El óxido nítrico induce además una disminución en la dimetilación de las lisinas 4 y 9 de la histona H3 por un mecanismo aún no descrito.

Abstract

In this thesis we have analyzed Ras proteins activation by two factors synthesised in inflammatory conditions: the cyclopentenone prostaglandin PGA_1 , and nitric oxide. Our results indicate that PGA_1 binds to cysteines 118 and 184 of H-Ras, and activates the three Ras isoforms, and suggest that GTP (at least *in vitro*) and guanine nucleotide exchange factors (GEFs) are not required for Ras activation by PGA_1 , in contrast to Ras classical activation mechanism. Ras stimulation by PGA_1 occurs in endoplasmic reticulum and Golgi apparatus, and induces ERK activation. The biological outcomes elicited by PGA_1 Ras activation are depending of the cellular context; meanwhile H- and N- Ras stimulation by PGA_1 induces apoptosis in fibroblast cells; H-Ras activation by PGA_1 , in co-stimulation with NGF, increases differentiation in PC12 cells. On the other hand, nitric oxide activates the three Ras isoforms, and this stimulation takes place in endomembrane regions, as by PGA_1 . Finally, nitric oxide induces a reduction in H3 histone dimethylation (lysines 4 and 9) by an unknown mechanism.

CLAVE DE ABREVIATURAS	9
INTRODUCCIÓN	11
- 1. Ras:	11
- 1.1 Estructura de Ras	12
- 1.2 Activación de Ras	14
- 1.3 Vías efectoras	14
- 1.4 Isoformas de Ras	15
- 1.5 Modificación postraducciona y localización de Ras	17
- 1.6 Efectos celulares y biológicos	19
-2. Prostaglandinas:	21
- 2.1 Funciones	21
- 2.2 Prostaglandinas ciclopentenonas	22
- 2.2.1 PGA_1 :	22
- 2.2.1.1 Efectos biológicos de PGA_1	23
- 2.2.1.2 Activación de rutas de señalización	23
- 3. Óxido nítrico:	23
- 3.1 Activación de rutas de señalización y efectos biológicos	24
- 3.2 Ras y óxido nítrico	24
- 4. Apoptosis:	25
- 4.1 Ras y apoptosis:	26
- 4.1.1 Ras y protección frente a apoptosis	27
- 4.1.2 Ras e inducción de apoptosis	28
- 4.1.3 Ras: proliferación o apoptosis	28
- 5. Diferenciación	29
- 6. Inflamación, prostaglandinas, óxido nítrico, Ras y cáncer.	29
OBJETIVOS	35

MATERIALES Y MÉTODOS	33
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
- 1. PGA₁ se une y activa a las proteínas Ras	41
- 1.1 PGA ₁ modifica a H-Ras <i>in Vitro</i>	41
- 1.2 PGA ₁ modifica a H-Ras <i>in vivo</i> .	44
- 1.3 PGA ₁ y activación de H-Ras wt y mutantes	46
- 1.4 PGA ₁ se une y activa a las tres isoformas de Ras	47
- 1.5 Activación de MAPK por PGA ₁ .	48
- 1.6 Modelo de activación de Ras por PGA ₁	50
- 2. Activación de Ras por óxido nítrico	53
- 2.1 Modificación de histonas por óxido nítrico	55
- 3. Localización de la activación de Ras por PGA₁ y óxido nítrico:	57
- 3.1 Estudio de la localización subcelular de Ras	57
- 3.2 Localización subcelular de la activación de Ras en respuesta a PGA ₁ y óxido nítrico	58
- 3.3 Rutas de señalización y localización de Ras	59
- 4. Efectos celulares de PGA₁	63
- 4.1 PGA ₁ favorece la diferenciación de células PC12	63
4.1.1. Ras e inducción de diferenciación por PGA ₁	63
- 4.2 PGA ₁ induce apoptosis	67
4.2.1. Ras e inducción de apoptosis por PGA ₁	70
CONCLUSIONES	77
BIBLIOGRAFÍA	78
APÉNDICES	96

CLAVE DE ABREVIATURAS

BS: suero bovino (Bovine Serum)

dKO: doble KO

EGF: factor de crecimiento epidérmico

EGFR: receptor del factor de crecimiento EGF

EM: Espectrometría de Masas

FBS: suero bovino fetal (Fetal Bovine Serum)

GAPs: GTPase-Activating Protein

GEFs: factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (Guanine Exchange Factors)

GDP: nucleótido de guanosina bifosfato

GTP: nucleótido de guanosina trifosfato

HS: suero de caballo (Horse Serum)

IAPs: proteínas inhibidoras de apoptosis

IEGs: genes de transcripción temprana

IL: interleuquina

IP: Ioduro de Propidio

KO: Knock-out

MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase

MEF: Mouse Embryonic Fibroblast

NGF: factor de crecimiento neuronal

NO: óxido nítrico

NOS: óxido nítrico sintetasa

O/N: toda la noche (overnight)

PGs: prostaglandinas

R.E.: retículo endoplásmico

ROS: radicales libres de oxígeno

Rpm: revoluciones por minuto

T.A: temperatura ambiente

TCR: receptor de células T (T Cell Receptor)

WB: Western Blot

Wt: wild type; fenotipo silvestre (funcional)

1. RAS

Las proteínas Ras son GTP-asas con una masa molecular de 21 KDa que intervienen en procesos esenciales para la célula como proliferación, diferenciación y apoptosis. En humanos existen 3 genes *ras*: *H*, *N* y *K-ras*, que codifican las cuatro isoformas de estas proteínas: H-, N-, K-Ras4A y K-Ras4B (las dos últimas, originadas por procesamiento alternativo del exón 4) (Rojas, 2002; Rojas, 2006).

1.1 Estructura de Ras

Las proteínas Ras contienen 189 aminoácidos, a excepción de K-Ras4B que posee 188. En su estructura primaria se pueden distinguir 4 regiones diferentes (Figura 1): la "región constante" comprende los primeros 85 aminoácidos y presenta una homología total entre las tres isoformas. Los siguientes 80 aminoácidos constituyen la denominada "región variable", en la cual la homología entre isoformas es del 80%. Seguidamente, la región carboxilo terminal (exceptuando los últimos cuatro aminoácidos), o "región hipervariable", se caracteriza por presentar tan solo un 4% de homología (Crespo and Leon, 2000). Los últimos cuatro aminoácidos o "CAJA CAAX" (C cisteína, A aminoácido alifático y X metionina o serina) constituyen un dominio esencial para la unión a membranas y para la actividad de estas proteínas, y será objeto de análisis en apartados posteriores.

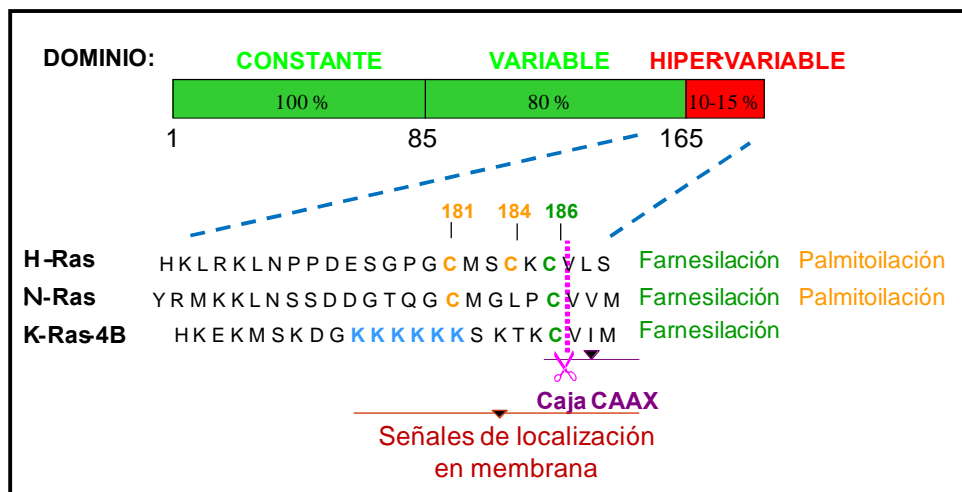


Figura 1. Estructura y modificaciones postraduccionales de las isoformas de Ras. Las cisteínas farnesiladas aparecen en verde y las palmitoiladas en naranja. Las región de polilisinas en K-Ras-4B aparece en azul. La línea punteada azul indica el lugar de proteólisis en la caja CAAX. Los porcentajes indican la homología entre las isoformas de Ras.

La estructura secundaria de las proteínas Ras presenta cuatro hélices α y seis láminas β dispuestas alternativamente y conectadas por nueve lazos (de Vos et al.,

1988). La estructura terciaria (Figura 2A) ha sido determinada gracias a estudios cristalográficos de la proteína normal y oncogénica, sin los últimos 18 aminoácidos (de Vos et al., 1988).

La mayoría de las mutaciones oncogénicas (que dan lugar a una proteína Ras hiperactiva), se producen en la región constante, concretamente en los residuos 12, 13, 16, 19, 59, 61, y 63, y en menor proporción, en los residuos 116, 117, 119, 144, o 146 de la región variable [revisado en (Malumbres and Pellicer, 1998)]. Estos residuos son los que establecen las uniones con el nucleótido de guanina: los residuos 10-16 (lazo 1 o lazo P) y 59-63 (lazo 4) interactúan con los grupos fosfato, los residuos 116-119 (lazo 7) y 145-147 (lazo 9) forman la región lateral de la oquedad donde se localiza el nucleótido de guanina y establecen interacciones con él (Malumbres and Pellicer, 1998) (Figura 2B).

1.2 Activación de Ras

Las proteínas Ras oscilan entre un estado inactivo y otro activo, dependiendo de si están unidas a GDP o GTP respectivamente. El estado de activación de Ras está controlado por dos grupos de proteínas: GEFs ("Guanine Exchange Factors" o factores intercambiadores de nucleótidos de guanina) que promueven el estado activo, y GAPs ("GT Pase-Activating Protein" o proteínas activadoras de GTPasa) que inducen el estado inactivo (Figura 2C) (Rojas, 2002; Rojas, 2006). Ras-GDP y Ras-GTP presentan conformaciones distintas en las regiones denominadas "switch I" y "switch II" (las dos regiones móviles de Ras) (Figura 3A y B) (Boriack-Sjodin et al., 1998; Vera et al., 1996). El switch I contiene el lazo 2 y la región efectora, y es esencial para la unión de los efectores, así como para la unión a los GAPs. El switch II, que abarca el lazo 4 y la hélice α 2, es la zona de interacción con los GEFs.

Cuando las proteínas Ras se encuentran en estado inactivo, unido a GDP, tienen inaccesible el switch I, pero pueden interactuar con GEFs a través del switch II. La interacción con los GEFs promueve la disociación del GDP unido a Ras, lo que facilita que en su lugar se una el GTP que existe en mayor concentración en la célula. En consecuencia, se produce un cambio conformacional en Ras que permite la interacción con efectores y GAPs a través del switch I (Figura 3C) (Hall et al., 2001; Wittinghofer and Pai, 1991). Las proteínas efectoras interactúan con Ras por un dominio de unión a Ras-GTP denominado Ras-Binding Domain o RBD (Herrmann et al., 1995; Huang et al., 1997). Las proteínas GAPs aceleran la hidrólisis de GTP al estimular la actividad GTPasa intrínseca de Ras, promoviendo el estado inactivo de las proteínas Ras y cerrando el ciclo de activación-inactivación.

En mamíferos se han identificado tres grupos de proteínas Ras-GEF: Sos (Sos1 y Sos2), Ras-GRF (Ras-GRF1 y Ras-GRF2), y Cal-DAG/Ras-GRP (Cal-DAG-II/Ras-GRP1 y Cal-DAG-III/Ras-GRP3) (Rojas, 2006). Por otro lado, se han descrito tres grupos principales de proteínas GAPs; p120GAP, "GAP-like" y NF1 (neurofibromina) (Rojas, 2006)

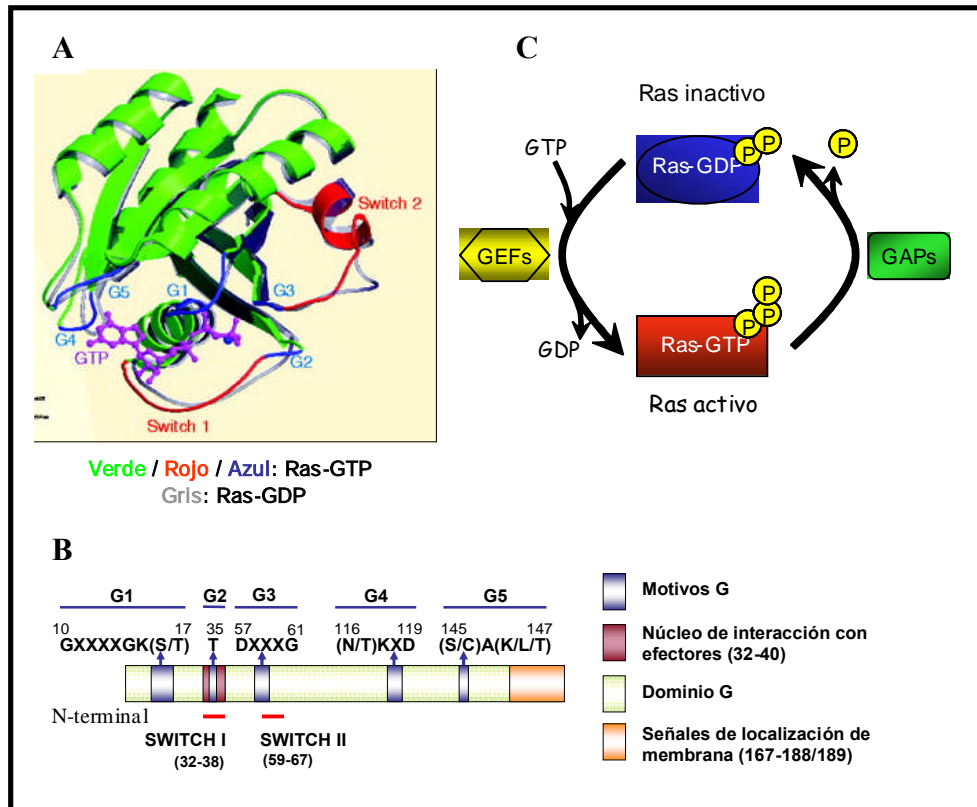


Figura 2. (A) Estructura tridimensional de Ras. Las zonas de Ras que sufren un mayor cambio en su conformación son las regiones switch I y II (rojo). Los "motivo G" (azul), conservados entre todas las proteínas G, son las zonas de interacción con el nucleótido. Esta figura ha sido tomada de Wennerberg et al., 2005. **B) Estructura esquematizada de Ras.** Los dominios G comprenden las regiones más conservadas de las proteínas G monoméricas. En el extremo C-terminal están los aminoácidos que intervienen en la localización en membrana (para mayor detalle ver Figura 1). **C) Ciclo de activación de Ras** (P: fosfato).

Ras se activa en respuesta a señales extracelulares como factores de crecimiento (Gibbs et al., 1990; Muroya et al., 1992; Satoh et al., 1990), citoquinas (Satoh et al., 1991) y prostaglandinas ciclopentanonas (Wang et al., 2005). La señal puede estar mediada por receptores tirosina quinasa como los receptores de EGF, FGF y PDGF (Normanno et al., 2006; Warren and Landgraf, 2006), receptores de citoquinas como el de IL-2 (Satoh et al., 1992), receptores de células T (Downward et al., 1990), receptores de prostaglandinas ciclopentanonas (Repasky et al., 2007) y subunidades β y γ de las proteínas G heterotriméricas (Crespo et al., 1994). Además, Ras puede activarse por otros estímulos independientes de receptores de membrana y originados durante procesos inflamatorios, como: estrés redox (Lander et al., 1995b),

óxido nítrico (Lander et al., 1993) y prostaglandinas ciclopentenonas (Oliva et al., 2003).

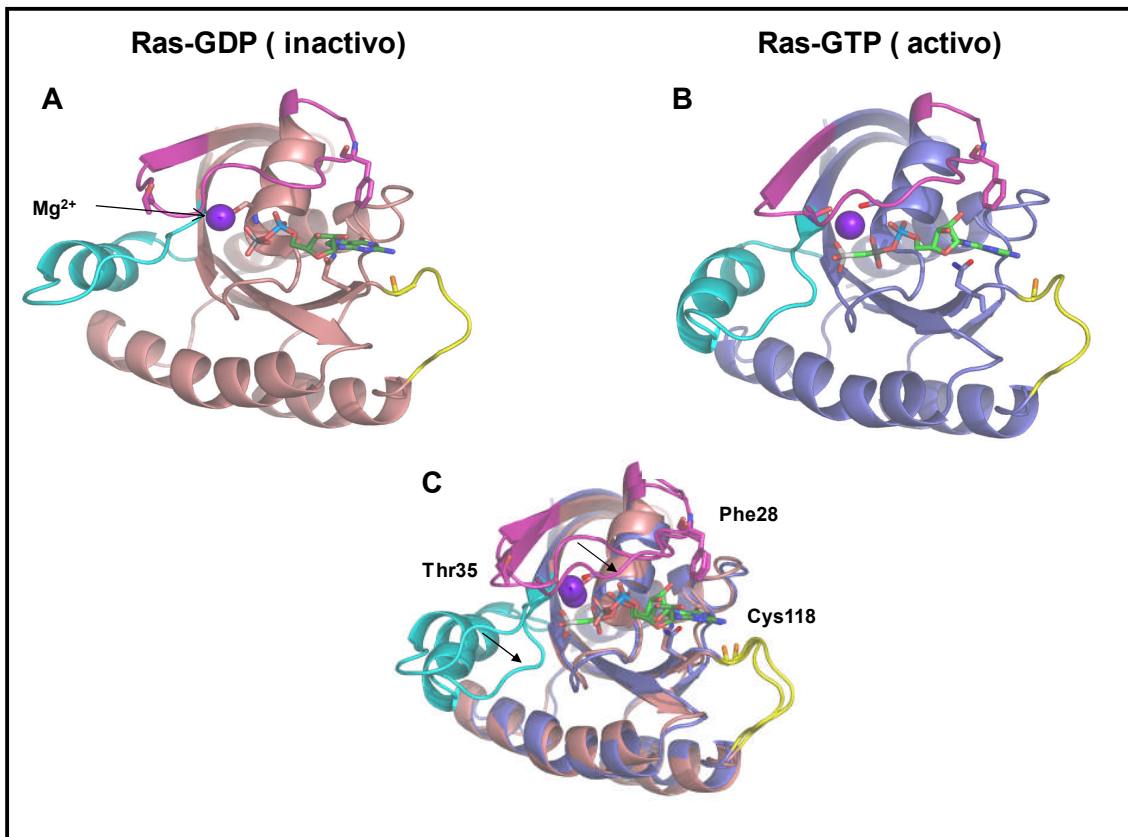


Figura 3. Conformación de Ras. A) Conformación de Ras-GDP (inactivo). B) Conformación de Ras-GTP (activo). C) Modificaciones conformacionales de Ras al activarse. **Fucsia:** Switch 1. **Azul:** Switch 2. **Rosa:** Ras:GDP. **Azul oscuro:** RasGTP

1.3 Vías efectoras

Ras-GTP puede activar distintas vías de señalización mediante la interacción con sus proteínas efectoras, siendo las más estudiadas las vías de Raf-MEK-ERK, PI3K-PDK-AKT y Ral-GDS-Ral (Figura 4). Otras proteínas efectoras de Ras son Rin-1 (Colicelli et al., 1991), Tiam1 (un GEF de Rac, otra GTPasa monomérica de la superfamilia de Ras (Lambert et al., 2002), PLC ϵ (Kelley et al., 2001) y Nore1/Rassf1 (Vavvas et al., 1998).

Ras-GTP estimula la vía Raf-MEK-ERK al inducir la estimulación de Raf (Kikuchi and Williams, 1994). Raf activado fosforila a MEK1 y MEK2 y éstas fosforilan a ERK1 y ERK2, que pueden entonces translocarse al núcleo. Las proteínas ERK son serín-treonín quinasas con substratos citoplasmáticos y nucleares: entre los primeros están Sos (Dong et al., 1996), Mnk (Waskiewicz et al., 1997) y Rsk (Gavin and Nebreda, 1999) y, entre los nucleares, MSKs (Deak et al., 1998) y diversos factores de transcripción como Elk-1 (Marais et al., 1993) y c-Myc (Gupta et al., 1993). Esta vía

está implicada en la inducción de proliferación, apoptosis y diferenciación (Cox and Der, 2003; Crespo and Leon, 2000).

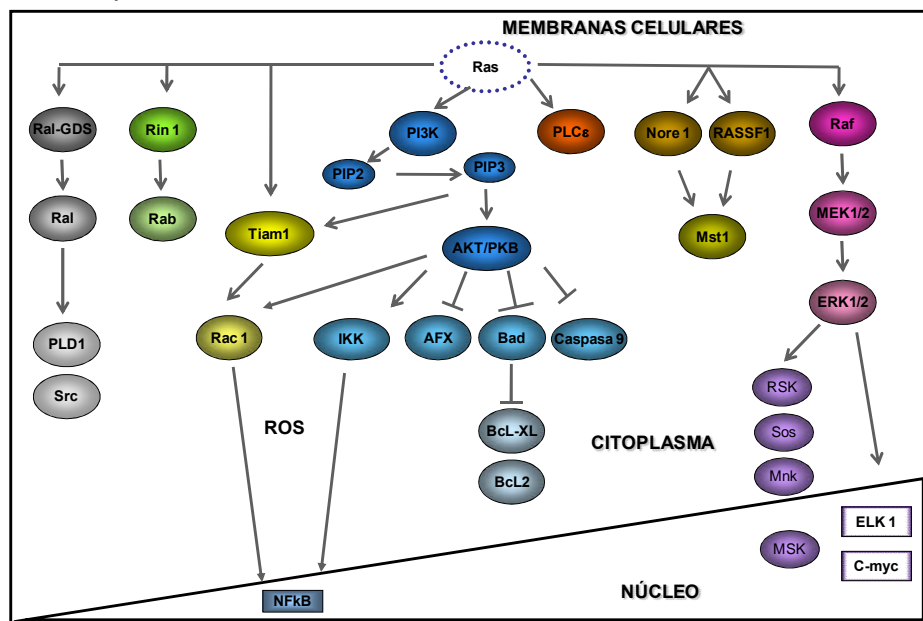


Figura 4. Representación esquemática de las principales vías efectoras de Ras. Terminación en flecha: activación. Terminación en segmento: inhibición.

La vía Ras-PI3K-PDK-AKT se estimula tras la interacción de Ras con el dominio catalítico de la fosfatidil-inositol-3-quinasa (PI3K). PI3K fosforila a 4,5-P₂-fosfoinosítoles de la membrana plasmática interna para producir 3,4,5-P₃-fosfoinosítoles (PI3Ps) (Carpenter and Cantley, 1996). Los PI3Ps reclutan a la quinasa AKT/PKB a la membrana, permitiendo su fosforilación por PDK1 (Alessi et al., 1997) y promoviendo eventos celulares críticos para la supervivencia celular al iniciarse, entre otros, la inhibición de vías apoptóticas (Gupta et al., 2004; Shi et al., 2004; Wendel et al., 2004).

Ral-GDS es un GEF de Ral, otra GTPasa monomérica de la superfamilia Ras, que se activa por Ras-GTP (Spaargaren and Bischoff, 1994; Wolthuis et al., 1998). Ral está involucrado en la regulación del ciclo celular (Henry et al., 2000), en la endocitosis mediada por receptor (Nakashima et al., 1999), en la activación de PLD1 (Frankel et al., 1999), en la regulación del citoesqueleto de actina (Ohta et al., 1999) y en la activación de Src (Goi et al., 2000).

1.4 Isoformas de Ras

Aunque tradicionalmente se pensaba que las tres isoformas de Ras tenían el mismo comportamiento, se han descrito un elevado número de evidencias que demuestran la especificidad de la señalización por cada una de ellas.

En primer lugar, cada isoforma estimula de manera diferente a las vías efectoras: mientras que K-Ras V12 (mutante hiperactivo) recluta y activa a Raf-1 más potentemente que H- y N-Ras V12, y estimula la vía de Rac más intensamente que H-Ras (Walsh and Bar-Sagi, 2001), H-Ras V12 activa a PI3K más potentemente que K-Ras V12 (Voice et al., 1999; Yan et al., 1998).

En segundo lugar, las isoformas de Ras promueven con diferente intensidad los efectos celulares desencadenados por estas proteínas (Choi et al., 2004); el mutante K-Ras4B V12 promueve migración celular en mayor medida que las otras isoformas, mientras que N-Ras V12 y K-Ras4A V12 favorecen el crecimiento independiente de adhesión a sustrato (Voice et al., 1999). En las respuestas de cada una de las isoformas también influye el tipo de estímulo y el tipo celular (Ehrhardt et al., 2004; Millan et al., 2003).

Además, la proliferación mediada por ERK es originada principalmente por H-Ras, mientras que la supervivencia mediada por PI3K es originada tanto por H- como por N- Ras (Rosseland et al., 2008).

La mutación P34G de las proteínas Ras (residuo localizado en el switch I) disminuye la capacidad transformante y la activación de las vías RalGDS/Ral A/PLD y Ras/Rac por N- y K- Ras, pero no produce este efecto en H-Ras (Oliva et al., 2004).

Por otro lado, la versión oncogénica de cada isoforma está más frecuentemente vinculada a determinados tipos tumorales (Adjei, 2001). Así, mutaciones hiperactivas de H-Ras aparecen en tumores de vejiga y glándulas salivares y de N-Ras en melanomas, mientras que de K-Ras se encuentran en tejidos derivados del endodermo, como páncreas, pulmón y cáncer colorrectal (Bos, 1989). También hay diferencias en la frecuencia de mutación de cada isoforma, siendo K-Ras la isoforma que más frecuentemente aparece en tumores, encontrándose en el 21% de todos los casos (elevándose el porcentaje al 80-90% en carcinomas de páncreas) (Bos, 1989).

La pérdida de expresión de cada uno de los genes también tiene consecuencias diferentes. Los ratones "Knock-Out" (KO) para *N-ras*, *H-ras*, y los doble KO *H-* y *N-ras* son viables y no presentan ningún fenotipo diferente al de los ratones normales, sugiriendo que *H-* y *N-ras* no son necesarios durante el desarrollo embrionario (Esteban et al., 2001; Umanoff et al., 1995). Sin embargo, los embriones *K-ras*^{-/-} mueren en las fases E12-E14 de gestación, indicando que *K-ras* es el único miembro de la familia Ras indispensable durante la embriogénesis (Johnson et al., 1997).

Otra diferencia se halla en el conjunto de genes sobre los que induce activación

transcripcional cada una de las isoformas; los MEFs *H-Ras* $-/-$ presentan 15 genes expresados diferencialmente respecto al wt, mientras los MEFs *N-Ras* $-/-$ muestran diferencias en 38 genes, y los doble KO *H-* y *N-Ras* en 634 (Castellano et al., 2007).

Algunos autores defienden que las diferencias entre las isoformas de Ras se deben, en gran parte, a su distinta localización subcelular, tanto en microdominios de la membrana plasmática (Arozarena et al., 2004; Roy et al., 2005), como en endomembranas (Chiu et al., 2002; Perez de Castro et al., 2004).

1.5 Modificación postraducciona y localización de Ras

Las proteínas Ras requieren de modificaciones postraduccionales, necesarias para que Ras sea funcional (Willumsen et al., 1984). Las primeras modificaciones son comunes a las tres isoformas, y comienzan con la farnesilación de la cisteína C-terminal comprendida en el motivo denominado "caja CAAX" (Hancock et al., 1991b; Hancock et al., 1989). Esta modificación aumenta la hidrofobicidad de la proteína, favoreciendo la unión de Ras a la membrana del retículo endoplásmico y aparato de Golgi, donde se encuentran las enzimas que continuarán las modificaciones postraduccionales (Choy et al., 1999). La siguiente modificación es un corte proteolítico de los residuos AAX y la carboxi-metilación de la cisteína de la caja CAAX (Figura 5) (Hancock et al., 1991a). Posteriormente, H- y N-Ras se palmitoilan, H-Ras en las cisteínas 181 y 184, y N-Ras en la cisteína 181 que posee en la región hipervariable. Una vez palmitoiladas, H y N- Ras se dirigen a membrana plasmática mediante transporte vesicular (Choy et al., 1999; Hancock et al., 1989). Sin embargo, K-Ras 4B, una vez carboxi-metilado, se transloca a membrana plasmática mediante un transporte independiente del aparato de Golgi aún no caracterizado. Una vez allí, establece interacciones electrostáticas entre la serie de lisinas de su región C-terminal con fosfolípidos presentes en la membrana plasmática (Hancock et al., 1990; Wright and Philips, 2006).

Una vez en membrana plasmática, cada una de las isoformas de Ras se agrupa en "nanoclusters" formados por 6-8 proteínas Ras (Prior et al., 2001). Cada tipo de "nanoclusters" tiene diferentes requerimientos de colesterol de la membrana plasmática. Así, los nanoclusters formados por H-Ras-GDP y N-Ras-GTP son dependientes de colesterol, mientras que los integrados por H-Ras-GTP, N-Ras-GDP y K-Ras son independientes. La función de los nanoclusters no está totalmente dilucidada. La hipótesis defiende que los nanoclusters provocan un aumento de la estimulación de Ras, ya que la cantidad de Sos necesaria para producir la activación de Ras en nanoclusters es inferior a la que se necesita para las proteínas Ras no

agrupadas (Gureasko et al., 2008; Prior et al., 2001).

Posteriormente, las proteínas Ras se reciclan desde la membrana plasmática hacia membranas del interior celular. H- y N-Ras oscilan entre la membrana plasmática y endomembranas siguiendo ciclos de despalmitoilación-palmitoilación, siendo mayor el tiempo de residencia en membrana plasmática con la di-palmitoilación (Goodwin et al., 2005; Rocks et al., 2005). Por otro lado, K-Ras se transloca desde la membrana plasmática a mitocondrias al ser fosforilada por PKC en la serina 181. Una vez en mitocondria, inicia la activación de vías de señalización implicadas en apoptosis (Bivona et al., 2006).

Las proteínas Ras están localizadas en membrana plasmática, retículo endoplásmico, aparato de Golgi y mitocondria, existiendo diferencias en el grado de asociación de cada isoforma a endomembranas. Así, N- y H- Ras se localizan en mayor medida en estos compartimentos que K-Ras (Arozarena et al., 2004; Bivona et al., 2006; Rocks et al., 2005)

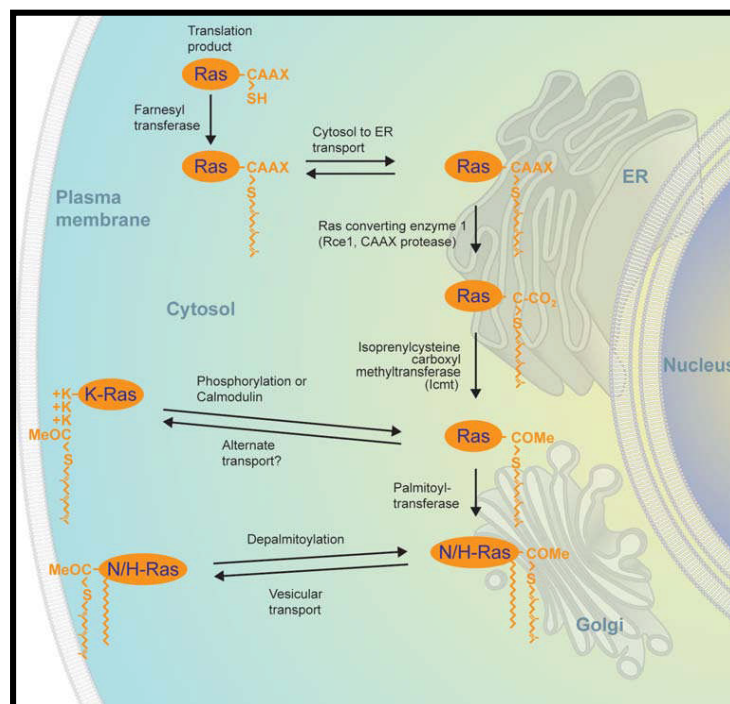


Figura 5. Modificaciones postraduccionales de Ras. Imagen tomada de (Mor and Philips, 2006)

La localización de Ras es esencial para su funcionalidad, tal como lo indica el hecho de que existan tanto Ras GEFs, como proteínas de andamiaje, que activan a Ras y a sus efectores en localizaciones subcelulares específicas. Así, RasGRP y RasGRF, activan a Ras tanto en membrana plasmática, como en el aparato de Golgi (RasGRP) (Bivona et al., 2003) o en retículo endoplásmico (RasGRF) (Arozarena et

al., 2004). La activación de Ras ocurre en membrana plasmática o en endomembranas en función de la intensidad del estímulo en el caso de RasGRP, o de la naturaleza del mismo en el caso de RasGRF (Matallanas et al., 2006).

Entre las proteínas de andamiaje de las vías efectoras de Ras se encuentran: KSR, que participa específicamente en la activación de ERK tras la activación de Ras en membrana plasmática; MP1 y β -arrestina, implicadas en la activación de MEK y ERK en endosomas; y Sef, que participa en el andamiaje de MEK y ERK en el aparato de Golgi (Mor and Philips, 2006).

Dependiendo de la localización en la que se activen las proteínas Ras, se desencadenan diferentes vías efectoras y destinos celulares. Se ha descrito que H-Ras hiperactivo localizado en retículo endoplásmico, activa a JNK más potentemente que en otras localizaciones, estimulando más débilmente las vías de Raf-MEK-ERK y PI3K-PDK-AKT (Chiu et al., 2002). Sin embargo, otros autores han descrito una estimulación mayor de Raf-MEK-ERK y PI3K-PDK-AKT en este compartimento (Matallanas et al., 2006). Por otro lado, Ras hiperactivo localizado en el aparato de Golgi, produce una potente inducción de ERK y AKT, mientras que origina una activación muy débil de JNK (Chiu et al., 2002). Otros autores han encontrado que Ras-GTP, en el aparato de Golgi, activa preferentemente la ruta de RalGDS (Matallanas et al., 2006). Por otra parte, Ras localizado en balsas lipídicas (dominios de membranas enriquecidos en esfingolípidos y colesterol) desencadena una intensa estimulación de ERK y RalGDS, mientras que en membrana desordenada produce una intensa elevación de la actividad de ERK y PI3K (Matallanas et al., 2006).

Además, Ras induce la transcripción de un conjunto específico de genes dependiendo de dónde se haya activado, a excepción de si la estimulación ocurre en balsas lipídicas, donde solamente se inducen algunos de los genes que son comunes con el resto de los sitios de activación (Agudo-Ibanez et al., 2007). La sobre-expresión y anclaje de Ras a distintas regiones subcelulares ocasiona efectos celulares específicos. Así, la unión de Ras-V12 a retículo endoplásmico favorece supervivencia celular y protege de apoptosis, mientras que el anclaje en balsas lipídicas o membrana desordenada favorece proliferación y transformación. La activación en el aparato de Golgi y balsas lipídicas es totalmente dispensable para el crecimiento y transformación celular (Matallanas et al., 2006).

1.6 Efectos celulares y biológicos

Las proteínas Ras juegan un papel esencial en procesos fisiológicos como; proliferación (Costa et al., 2008), motilidad (Alexandrova et al., 2006), tráfico

intracelular (Giovannardi et al., 2002), morfogénesis (Kumar et al., 2005), respuesta inmune (Perez de Castro et al., 2004), angiogénesis (Su et al., 1993; Zabrenetzky et al., 1994) apoptosis y diferenciación (ver apartado "Apoptosis" y "Diferenciación" de esta Introducción). El efecto celular depende en gran medida del contexto y tipo celular [en (Cox and Der, 2003)].

Ras también está implicado en procesos patológicos. Mutaciones puntuales de los genes *ras* (ver apartado "Estructura de Ras"), dan lugar a proteínas constitutivamente activas que están implicadas en el desarrollo de tumores (Bos, 1989). Estas versiones hiperactivas favorecen la transformación de líneas celulares (Shih et al., 1981) e inducen la formación de tumores en ratones transgénicos (Adams and Cory, 1991), encontrándose en el 30% de los tumores humanos (Adjei, 2001) (Tabla 1). Generalmente, sólo una de las isoformas está mutada en un tumor y la frecuencia en la que aparece mutada cada isoforma depende del tejido y tipo tumoral (ver apartado "Isoformas de Ras" de esta Introducción).

<i>Cáncer o tejido tumoral</i>	<i>Frecuencia mutación (%)</i>	<i>Isoforma predominante de Ras mutado</i>
Cáncer de pulmón no microcítico (adenocarcinoma)	33	K
Colorrectal	44	K
Páncreas	90	K
Tiroideo		
Folicular	53	H, K, N
Papilar indiferenciado	60	H, K, N
Papilar	0	H, K, N
Seminoma	43	K, N
Melanoma	13	N
Vejiga	10	H
Hígado	30	N
Riñón	10	H
Síndrome mielodisplásico	40	N, K
Leucemia mieloide aguda	30	N

Tabla 1. Mutaciones de Ras en tumores humanos. Tabla modificada de Adjei, 2001.

Por otro lado, mutaciones activadoras de los diferentes miembros de la ruta Ras-Raf-MEK-ERK y sus reguladores también están implicadas en patologías relacionadas con el desarrollo, como son el síndrome de Costello, síndrome de Noonan, el síndrome cardio-facial-cutáneo y el síndrome Leopard, los cuales se han englobado bajo la denominación de síndromes **Neuro-Cardio-Facial-Cutáneo (NCFC)** (Krab et al., 2008).

2. PROSTAGLANDINAS

Las prostaglandinas (PGs) son compuestos de 20 carbonos formados a partir del metabolismo del ácido araquidónico (AA), el cual es liberado a partir de fosfolípidos de membrana por la fosfolipasa A₂ (PLA₂). Las ciclooxygenasas (COX1 y COX2) convierten al AA en PGH₂, que es a su vez transformado en los precursores de las diferentes familias de PGs por PG-sintasas específicas (Nosjean and Boutin, 2002; Straus and Glass, 2001) (Figura 6). Las PGs tienen en común un anillo de 5 carbonos pero difieren en los sustituyentes del anillo y de las cadenas laterales.

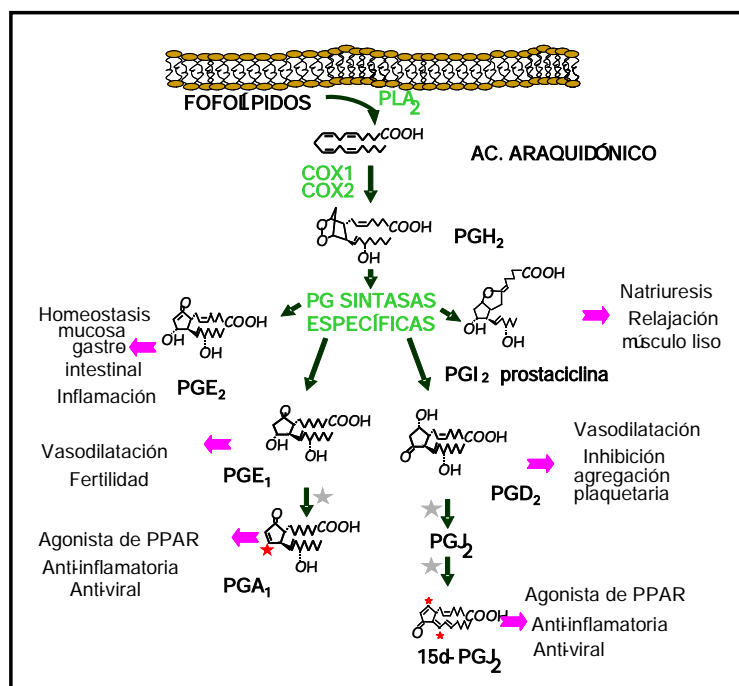


Figura 6. Ruta de biosíntesis de PGs y sus efectos. Las ciclopentenonas (PGA₁, PGJ₂ y 15d-PGJ₂) se producen por deshidratación espontánea (señalada por una estrella gris). Las estrellas rojas indican los carbonos β capaces de formar aductos de Michael.

2.1 Funciones

Las PGs actúan de forma autocrina o paracrina, produciendo una gran variedad de efectos celulares entre los que se encuentran vasodilatación (Kumazawa et al., 2007), vasoconstricción (Arikawa et al., 2006), agregación plaquetaria (Rolin et al., 2007), regulación del sistema inmune e inflamación (Kabashima et al., 2003; Kaneko et al., 2008), regulación de la homeostasis gastrointestinal (Hatazawa et al., 2007), contracción uterina (Doheny et al., 2007) y regulación de la temperatura corporal y del dolor (Hall et al., 2007; Lazarus et al., 2007).

2.2 Prostaglandinas ciclopentenonas

Existen dos familias de PGs ciclopentenonas (cyPG), A y J, las cuales se forman por deshidratación espontánea de sus precursoras, las PGs E y D respectivamente. Las cyPGs se diferencian de las PGs ciclopentanonas en que poseen un carbonilo α,β -insaturado en el anillo. Este carbono β es un centro electrofílico capaz de formar aductos de Michael con nucleófilos tales como los grupos SH de cisteínas (Figura 7) (Hubich and Sholukh, 2006).

Así, 15dPGJ₂ forma aductos de Michael con I κ B-quinasa (Castrillo et al., 2000; Rossi et al., 2000), con el factor de transcripción c-Jun (Perez-Sala et al., 2003), el factor de iniciación de la traducción eIF4A (Kim et al., 2007), G-actina (Aldini et al., 2007; Gayarre et al., 2005) y H-Ras (Oliva et al., 2003), entre otros.

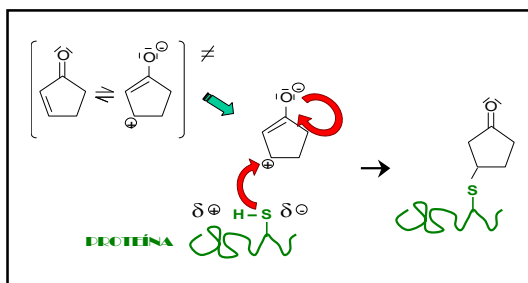


Figura 7. Formación del aducto de Michael. La forma resonante de la ciclopentenona aparece entre corchetes. El movimiento de los electrones en la reacción con la proteína se representa con flechas rojas.

La 15dPGJ₂ se une específicamente a H-Ras mediante la formación de un aducto de Michael con la cisteína 184, lo que a su vez conduce a la activación de Ras, y, en consecuencia, a la fosforilación y activación de ERK-1/2. Sin embargo, K y N-Ras (que no poseen una cisteína 184) no unen 15dPGJ₂, ni son activados por ésta (Oliva et al., 2003). El tratamiento tópico de ratones con DMBA y TPA promueve la formación de papilomas (Balmain et al., 1984) y la presencia de 15dPGJ₂ incrementa la tasa de formación, el tamaño, y la vascularización de los mismos, ya que la activación de H-Ras por 15dPGJ₂ inhibe la apoptosis inducida por DMBA (Millan et al., 2006). Además, 15dPGJ₂ produce avance en el ciclo celular (Oliva et al., 2003).

La 15dPGJ₂ está relacionada con la finalización de la inflamación, ya que favorece la apoptosis de macrófagos (Hortelano et al., 2000) e inhibe la vía de NF- κ B (Castrillo et al., 2000; Cernuda-Morollon et al., 2001; Rossi et al., 2000).

2.2.1 PGA₁

La prostaglandina ciclopentenona PGA₁ se forma a partir de la deshidratación espontánea de la prostaglandina ciclopentanona PGE₁ (Figura 6).

2.2.1.1 Efectos biológicos de PGA_1

La PGA_1 ejerce diversos efectos dependiendo del contexto y el tipo celular. Así, se ha descrito una acción neuroprotectora en condiciones de isquemia cerebral (Zhang et al., 2008), antiproliferativa no tóxica en células derivadas de eritroleucemia (Santoro et al., 1986), apoptótica en células gástricas epiteliales y endoteliales (Erl et al., 2004; Liu et al., 2003), parada de ciclo celular en fase G1 en células HeLa y vasculares (Ohno et al., 1988; Sasaguri et al., 1992), antiviral (Rossi et al., 1997) e induce diferenciación de células de eritroleucemia de Friend (Santoro et al., 1979).

2.2.1.2 Activación de rutas señalización

PGA_1 interacciona con gran variedad de moléculas en el interior celular; entre ellas, activa a PPAR, principalmente al subtipo $\text{PPAR}\delta$, implicado en diferenciación de adipocitos (Yu et al., 1995), induce la expresión de las proteínas de estrés HO-1, HSF-1, HSP-90 α , mantiene la expresión de HSP-90 β , disminuye la de APAF-1 (Xu et al., 2007), e inhibe NF- κ B (Rossi et al., 2000). Además, estimula la expresión y actividad de GST, GSPx y GSRd, enzimas implicados en el metabolismo del glutatión (protector frente a citotoxicidad por compuestos electrofílicos), siendo la intensidad de la inducción dependiente de tipo celular (de Bittencourt et al., 1998).

Por otro lado, PGA_1 potencia la formación de radicales libres de oxígeno (ROS) y la activación de ERK, en células coestimuladas con TNF- α , sin tener efectos sobre la activación de p38, ni JNK (Bureau et al., 2002). Otros autores, sin embargo, han descrito que induce activación de JNK (Liu et al., 2003).

PGA_1 también inhibe síntesis proteica en la línea celular derivada de leucemia, K562, sin afectar a la síntesis de mRNA, ni de DNA (Santoro et al., 1986). Recientemente, se ha descrito su unión a vimentina (Gharbi et al., 2007).

3. ÓXIDO NÍTRICO

El óxido nítrico (NO) es un gas muy reactivo debido a que posee un electrón desapareado y soluble en agua y lípidos, por lo que difunde libremente desde donde se origina hasta donde actúa (Figura 8). Se sintetiza en el interior celular a partir de L-arginina y NADPH, por la acción de las enzimas óxido nítrico sintetasas (NOS), de las cuales se conocen 3 isoformas; eNOS, nNOS e iNOS. Las dos primeras producen cantidades moderadas de óxido nítrico, en función de los niveles intracelulares de calcio, mientras que la tercera produce elevadas concentraciones de NO al inducirse en respuesta a citoquinas, endotoxinas o micobacterias (Xu and Liu, 1998).

3.1 Activación de rutas señalización y efectos biológicos.

Una de las principales rutas efectoras de la señalización por NO es la guanilil-ciclasa sensible a óxido nítrico. La activación de este enzima, induce la formación de gran cantidad de cGMP, el cual a su vez activa a proteínas quinasas, fosfodiesterasas y canales iónicos (Friebe and Koesling, 2003), cuyos efectos finales ocasionan: aumento del flujo sanguíneo (Ignarro et al., 1987; Waldman and Murad, 1987), inhibición de adherencia plaquetaria (Radomski et al., 1987), y modulación de la señalización en el sistema nervioso central y periférico (Bredt et al., 1991a; Bredt et al., 1991b).

Además, el óxido nítrico actúa independientemente de la guanilil-ciclasa, al nitrosilar a gran variedad de moléculas intracelulares entre las que se encuentran Ras, NF- κ B, el factor inducido por hipoxia HIF, metaloproteinasas y factores de transcripción dependientes de zinc [revisado en (Martinez-Ruiz and Lamas, 2004)].

Otra de sus funciones destacadas es la modulación del sistema inmune. El NO ejerce una potente acción antimicrobiana al inhibir la reparación y síntesis de ADN, bloquear la síntesis proteica, modificar centros tiol y metálicos implicados en funciones reguladoras y catalíticas críticas para la supervivencia de los microorganismos, y al peroxidar lípidos de membrana, entre otros [revisado en (Bogdan, 2001)].

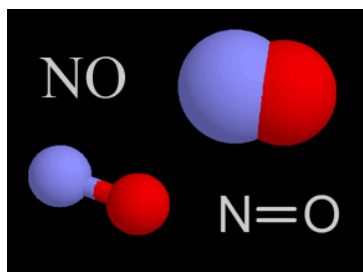


Figura 8. Representación esquemática del óxido nítrico.
(Imagen tomada de la página web “Ventanas al Universo”).

3.2 Ras y óxido nítrico

El óxido nítrico activa a Ras y a las rutas efectoras Raf-MEK-ERK y PI3K-PDK-AKT (Deora et al., 1998; Lander et al., 1993; Oliva et al., 2003; Wang et al., 2005). La activación de Ras ocurre de forma independiente de RasGEFs (resultados *in vitro*). Así, la liberación del GDP unido a Ras en estado inactivo, se produce por el cambio electrónico generado por la unión del óxido nítrico, después de reaccionar con el O₂, en la cisteína 118, facilitándose la unión de GTP y la activación de Ras (Heo et al., 2005). El mutante Ras-C118S, no une, ni se activa por óxido nítrico, sin embargo, es activable por otros estímulos como receptores tirosin-quinasa (Mott et al., 1997). Las proteínas Ras pueden modificarse en el residuo 118 por otras moléculas sintetizadas en respuesta a estrés como el glutatión y radicales libres de oxígeno (ROS) (Lander et

al., 1995b). La activación de Ras por NO se ha relacionado con la inducción de supervivencia celular en neuronas, al activar de forma sostenida PI3K-PDK-AKT (Jeong et al., 2002; Teng et al., 1999). Además, se ha propuesto que la activación que ejerce el óxido nítrico sobre linfocitos T está mediada por Ras (Lander, 1996).

4. APOPTOSIS

El número de células que tiene un organismo está determinado por la proliferación y muerte celular. Se han descrito diferentes tipos de muerte celular, las cuales pueden clasificarse en apoptosis, necrosis, catástrofe mitótica y autofagia (aunque éstas dos últimas no siempre ocasionan muerte celular, ya que puede superarse la crisis en el primer caso, o cumplir otras funciones, en el segundo) (Galluzzi et al., 2007). Se ha descrito también un subtipo de apoptosis inducida por pérdida de adhesión a sustrato, la cual se denomina anoikis.

La muerte celular programada (las mencionadas anteriormente a excepción de la necrosis), es un proceso esencial para el control del número de células durante el desarrollo y mantenimiento de la homeostasis del adulto (Wyllie et al., 1980).

La apoptosis se caracteriza por condensación de la cromatina y su posterior fragmentación (Galluzzi et al., 2007). Además, en la mayoría de los casos, se produce proteólisis de zimógenos que dan lugar a caspasas y cambios en la membrana plasmática (Leist and Jaattela, 2001). La apoptosis puede iniciarse tanto por señales intrínsecas, como extrínsecas (Blank and Shiloh, 2007).

Las caspasas son una familia de proteasas que se clasifican en caspasas iniciadoras y ejecutoras (Figura 9). Entre las iniciadoras se encuentran: la caspasa 8, que transduce la señal apoptótica iniciada en receptores localizados en membrana plasmática; la caspasa 9, que media la transducción de apoptosis iniciada en la mitocondria; y la caspasa 12 (en ratón) y caspasa 4 (en humanos) que son activadas por estrés en el retículo endoplásmico (Galluzzi et al., 2007; Hengartner, 2000; Nakagawa et al., 2000). Estas caspasas activan a las caspasas 3, 6 y 7 (Figura 9), denominadas efectoras, las cuales al proteolizar a sus sustratos, promueven los eventos característicos de la apoptosis, como son: ruptura de la lámina nuclear, fragmentación cromatínica, proteólisis de PARP y desestabilización del esqueleto de actina que conlleva la pérdida de la morfología celular (Slee et al., 2001). Otro proceso característico de la apoptosis es la inversión de la fosfatidil-serina desde la membrana plasmática interna hacia la externa, conservándose intacta la integridad de la membrana en las fases iniciales (Vermes et al., 1995).

Otras proteínas implicadas en la ejecución de la apoptosis incluye a la familia Bcl-2, formada por las proteínas pro-apoptóticas Bax, Bad, Bid y Bim y las anti-apoptóticas Bcl-2, Bcl-X_L (Burlacu, 2003). Bad se fosforila en la posición 112 por p90RSK (activada por la ruta Raf-MEK-ERK) (Bonni et al., 1999), en la posición 155 por PKA (Lizcano et al., 2000) y por AKT en la posición 136 (del Peso et al., 1997). La fosforilación de Bad hace que no ejerza su función pro-apoptótica.

4.1 Ras y apoptosis

Clásicamente se ha relacionado la activación de las proteínas Ras con supervivencia y proliferación celular, sin embargo actualmente se sabe que Ras también puede regular la apoptosis (Cox and Der, 2003).

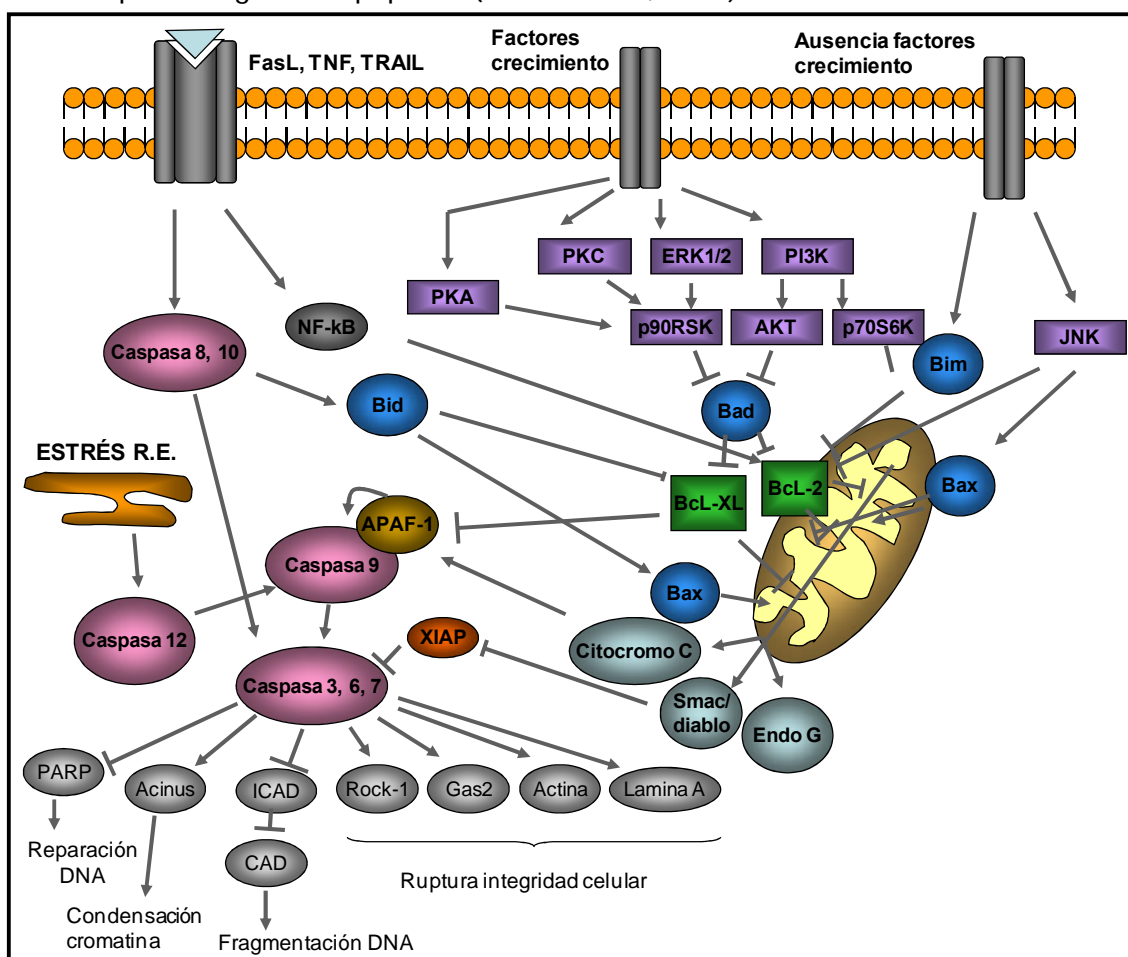


Figura 9. Representación esquemática de las principales vías efectoras de apoptosis. Quinasas (rectángulo morado), familia Bcl-2 (proapoptótica: círculo azul; anti-apoptótica: cuadrado verde), caspasas (elipse rosa), efectores de caspasas (círculo gris). Terminación en flecha: activación. Terminación en segmento: inhibición.

4.1.1 Ras y protección frente apoptosis

Ras favorece la supervivencia celular principalmente por la estimulación de las vías de PI3K-PDK-AKT, Raf-MEK-ERK y Tiam-Rac (Cox and Der, 2003) (Figura 10). La proteína AKT activada fosforila a Bad, por lo que ésta no puede inactivar a las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Bcl-X_L. Por otro lado, la activación de PI3K o B-Raf, dependiendo del tipo celular, mantiene la señal de supervivencia originada por la adhesión a sustrato. Además, la activación de Ras confiere resistencia a anoikis disminuyendo la cantidad de Bak o Bcl-X_L (Cox and Der, 2003). Ras activa a Rac a través de PI3K o mediante la interacción directa con el Rac- GEF, Tiam1. A su vez, Rac y PI3K activan a NF-κB, siendo NF-κB un factor de supervivencia que promueve la transcripción de genes anti-apoptóticos como los IAPs (Cox and Der, 2003).

La ruta de señalización Raf-MEK-ERK puede ser pro-apoptótica o anti-apoptótica, dependiendo de la naturaleza del estímulo y del tipo celular (Pearson et al., 2001). ERK ejerce su función anti-apoptótica al activar a RSK en el citoplasma, la cual fosforila a Bad (inhibiendo la función pro-apoptótica de ésta) y al factor de transcripción CREB que promueve supervivencia celular [revisado en (Cox and Der, 2003)]. ERK también fosforila a Bim (el cual es pro-apoptótico), induciendo su ubiquitinización y degradación. Asimismo, la fosforilación de ERK hace que se transloque al núcleo, donde fosforila al factor de transcripción Elk1, aumentando la transcripción de genes implicados en crecimiento y ciclo celular (Malumbres and Pellicer, 1998). Además, Bcl-2 puede unirse directamente a Ras en mitocondria y bloquear la apoptosis inducida por éste (Denis et al., 2003).

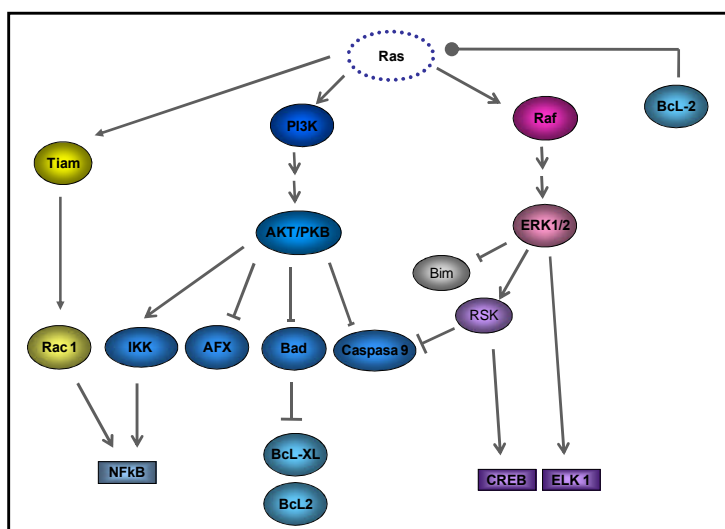


Figura 10. Vías efectoras de Ras protectoras de apoptosis. Representación esquemática de la rutas implicadas en la protección de apoptosis mediada por Ras. Flecha: activación. Terminación en flecha: activación. Terminación en segmento: inhibición.

4.1.2 Ras e inducción de apoptosis

Ras induce apoptosis principalmente a través de dos de sus rutas efectoras; Raf-MEK-ERK y Ras-RASSF1/Nore1-Mst1 (Cox and Der, 2003); y activando a p38 (Cuda et al., 2002) (Figura 11).

Las proteínas Ras se unen al complejo RASSF1A/Nore1/Mst 1 estimulando la apoptosis, siendo K-Ras V12 un inductor más potente que H-Ras V12 (Khokhlatchev et al., 2002). Por otro lado, ERK es secuestrada en el citoplasma por Bik, PEA-15 y DAPK (Chen et al., 2005; Formstecher et al., 2001; Mebratu et al., 2008). ERK favorece la apoptosis tanto por el bloqueo de su translocación al núcleo, como por el incremento de la señalización pro-apoptótica que induce en el citoplasma. A su vez, ERK fosforila a DAPK induciendo anoikis (Chen et al., 2005). ERK también disminuye la supervivencia celular en ausencia de suero, al inhibir la ruta PI3K-PDK-AKT (Amaravadi and Thompson, 2005). Además, K-Ras, tras ser fosforilado por PKC en la cisteína 181, se transloca a mitocondria, donde se une a Bcl-XL, convirtiéndolo en pro-apoptótico (Bivona et al., 2006).

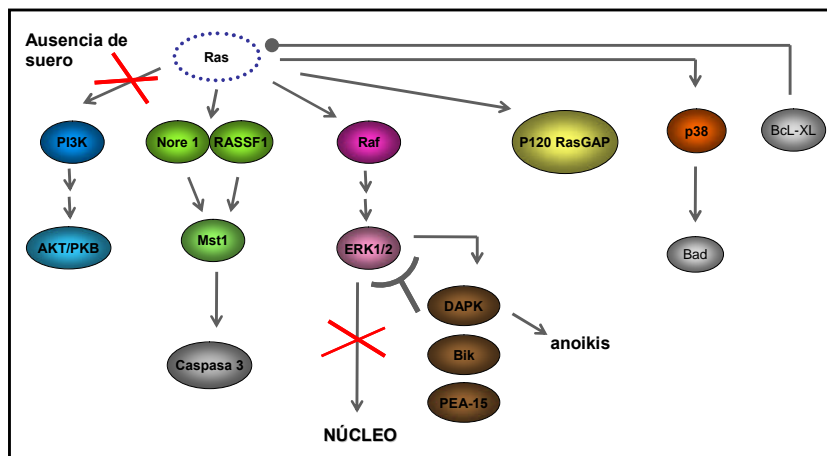


Figura 11. Ras e inducción de apoptosis. Representación esquemática. Terminación en flecha: activación. Terminación en segmento: inhibición. Terminación en punto: unión.

4.1.3 Ras: proliferación o apoptosis

Se ha propuesto que el destino celular inducido por las proteínas Ras puede estar determinado por la localización y disponibilidad de efectores (Cox and Der, 2003; Cuda et al., 2002). En un entorno pro-apoptótico, la activación de ERK ocurre por Ras activado en membrana plasmática, mientras que en condiciones de supervivencia es debido a la activación de Ras en endosomas (Wang et al., 2008). Otro factor determinante es la cinética y duración de la señal. En condiciones de diferenciación y supervivencia se produce una activación sostenida de ERK, mientras que en

condiciones de apoptosis se induce una señalización intensa pero transitoria (Wang et al., 2008).

La activación diferencial de cada una de las isoformas de Ras, es otro de los factores claves en el destino celular. Ejemplo de ello es lo que ocurre en condiciones de estrés oxidativo y radiaciones ionizantes: H-Ras, al activarse por estrés oxidativo, potencia la apoptosis inducida por estos compuestos; sin embargo K-Ras es anti-apoptótico en respuesta a estos estímulos (Cuda et al., 2002). Las radiaciones ionizantes en presencia de K-Ras V12 producen la activación de p38 (que aumenta la translocación de Bax incrementando la apoptosis), mientras que H-Ras V12, en respuesta a este mismo estímulo, activa PI3K-PDK-AKT disminuyendo la muerte celular (Choi et al., 2004).

5. DIFERENCIACIÓN

La activación de Ras induce diferenciación de precursores de células neuronales, adipocitos, células mieloides, linfoides y epiteliales. Sin embargo, produce inhibición de diferenciación en células musculares y tiroideas [revisado en (Crespo and Leon, 2000)]. Hay varias posibilidades para explicar estos comportamientos: diferencias en la cinética e intensidad de la activación de Ras, en la disponibilidad de efectores, en la inducción y parada de crecimiento, en bucles de retroalimentación y en la expresión de las isoformas de Ras en los tejidos y en el desarrollo (Crespo and Leon, 2000). La activación de Ras y ERK son necesarias para la inducción de diferenciación en la línea celular PC12 (feocromocitoma de rata). Éste es un modelo muy utilizado para estudiar diferenciación, en el que el tratamiento con NGF induce el desarrollo de neuritas. NGF activa al receptor TrkA, que estimula la ruta Raf-MEK-ERK de forma rápida e intensa y la vía Rap1-Raf-MEK-ERK con una activación de ERK menos intensa pero de mayor duración (Boglari et al., 1998; Vaudry et al., 2002).

6. INFLAMACIÓN, PROSTAGLANDINAS, ÓXIDO NÍTRICO, RAS Y CÁNCER

La inflamación es un proceso fisiológico en el que tanto el inicio, como el final, deben estar estrictamente controlados. Entre los factores reguladores se encuentran las prostaglandinas, las cuales pueden ser pro- o anti- inflamatorias. Siendo el balance entre ellas crucial en el desarrollo de la inflamación. Las prostaglandinas pro-

inflamatorias ejercen su efecto principalmente activando al factor de transcripción NF- κ B, clave en la expresión de genes como IL-1, IL-2, IL-6, e IL-8, potenciadores de la inflamación (Mandal et al., 2005). Las prostaglandinas anti-inflamatorias ejercen su efecto a través de la activación de PPAR- γ (Ricote et al., 1998), que inhibe la expresión de genes pro-inflamatorios. PGA_1 puede tener efectos pro- o anti-inflamatorios. Así, concentraciones en el rango de micromolar potencian la producción de citoquinas inducidas por TNF- α , favoreciendo el proceso inflamatorio (Bureau et al., 2002). Sin embargo, concentraciones más altas inhiben NF- κ B y la expresión de COX-2 (Mandal et al., 2005; Rossi et al., 2000), bloqueando el proceso inflamatorio.

Entre las moléculas efectoras de inflamación, se encuentra el NO, que a elevadas concentraciones tiene efectos citoestáticos. Además, el NO regula la producción y función de citoquinas, quimoquinas y factores de crecimiento pro- y anti-inflamatorios [revisado en (Bogdan, 2001)]. Tanto el NO, como las prostaglandinas, se encuentran en elevadas concentraciones en procesos inflamatorios al sintetizarse por la iNOS y la COX-2; enzimas inducibles que producen cantidades muy elevadas de estos compuestos, en comparación con sus homólogas constitutivas [revisado en (Mollace et al., 2005)].

La inflamación crónica incrementa el riesgo al desarrollo de tumores, tal como ocurre en pacientes de colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn, en los que existe una mayor predisposición al cáncer de colon, en pacientes con pancreatitis crónica (mayor predisposición al cáncer de páncreas), bronquitis (cáncer de pulmón), cistitis (cáncer de vejiga), o hepatitis (cáncer de hígado) (Thun et al., 2004). Sin embargo, los mecanismos moleculares, no son del todo conocidos (Coussens and Werb, 2002). Ras oncogénico está implicado en el desarrollo tumoral (Bos, 1989) y a su vez potencia la inflamación al inducir moléculas pro-inflamatorias (Karin, 2005), estableciendo una retroalimentación entre inflamación y cáncer. En esta tesis nos planteamos investigar la activación de Ras en respuesta a los factores inflamatorios PGA_1 y NO, así como identificar la localización subcelular en la que ocurre, las vías efectoras implicadas y los efectos biológicos derivados de esta estimulación.

OBJETIVOS

1. Estudiar los efectos de PGA_1 sobre las proteínas Ras
2. Analizar la activación de las proteínas Ras por óxido nítrico
3. Determinar la localización de la activación de las proteínas Ras por PGA_1 y óxido nítrico
4. Investigar las posibles modificaciones de las histonas causadas por óxido nítrico
5. Determinar la responsabilidad de las proteínas Ras en los efectos biológicos originados por PGA_1

MATERIALES Y MÉTODOS

Líneas celulares. COS7, fibroblastos de riñón de mono verde, ATCC: CRL-1651. NIH3T3, fibroblastos de ratón, ATCC: CRL-1658. Las células "H-Ras wt mezcla heterogénea de clones" han sido generadas en el laboratorio transfectando establemente células NIH3T3 con pCEFL-KZ-H-Ras wt. Las células "H-Ras wt clon" se obtuvieron mediante selección clonal de estas últimas. CH7C17, clon de Jurkat que no expresa ningún tipo de TCR, transfectadas establemente con TcRvb8 (Hewitt et al., 1992). HeLa, células endoteliales humanas de carcinoma de cérvix epitelial, ATCC: CCL-2. Los MEFs H-Ras $-/-$, N-Ras $-/-$, H- y N- Ras $-/-$ y Ras $+/+$, fueron cedidos amablemente por el Dr. Eugenio Santos (CIC, Salamanca) y han sido descritos previamente (Esteban et al., 2001; Ise et al., 2000; Tian et al., 2007; Umanoff et al., 1995). PC12, feocromocitoma de rata, ATCC: CRL-1721.

Cultivo celular. Las células CH7C17 se crecieron en RPMI 1640, 10% FBS, 400 μ g/ml hygromicina y 4 μ g/ml de puomicina. Las células PC12, en DMEM con 7,5 % HS, 7,5% FBS, 2 mM glutamina (Invitrogen) y 100 U/ml penicilina (Invitrogen). Los otros tipos celulares se crecieron en DMEM suplementado con 10 % FBS (10% BS en el caso de NIH3T3), 2 mM glutamina y 100 U/ml penicilina y 100 μ g/ml estreptomina.

Reactivos. Los reactivos para preparar los tampones fueron obtenidos de Sigma y Merck. La proteína recombinante H-Ras-wt y K-Ras-4B humano y GSNO (donante de óxido nítrico) de Calbiochem. 15dPGJ₂ de Cayman. U0126, tunicamicina, anisomicina, PGA₁, RNAsa, FGF y EGF de Sigma. NGF y DEA-NO de Alexis Chemicals. Anexina V-FITC y Anexina V-DY634 de Immunostep. Membranas de diálisis (Spectrum). Inhibidor de caspasas Z-Asp-CH₂-DCB de Enzo Life Sciences.

Inmunoprecipitaciones. Los extractos celulares se obtuvieron lisando las células en tampón 25 mM HEPES pH 7,5, 0,3 M NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM EDTA, 1 % Tritón, 20 mM β -glicerofosfato, 0,1 % SDS, 0,5% desoxicolato, 0,5 mM DTT, con los inhibidores 0,5 mM PMSF, 2 μ g/ml leupeptina y 0,1 mM Na₃VO₄. Los extractos se incubaron con 2 μ g de anticuerpo anti-HA durante 2 h en rotación a 4°C, y posteriormente con la resina GammaBindTMPlus (Amersham) al 50 % en buffer de lisis durante 1 h y se lavaron tres veces en tampón de lisis.

Anticuerpos.

	<i>casa comercial</i>	<i>referencia</i>	<i>dilución</i>	<i>incubación</i>
acetil H4	Upsate	06-866	1/1.000	O/N, 4°C
actina	Santa Cruz	sc-47778	1/1.000	1h, T.A.
AU5	covance	MMS-135	1/1.000	1h, T.A.
c Raf	BD Biosciences	610151	1/1.000	O/N, 4°C
caspasa 12	Cell Signaling	2202	1/1.000	O/N, 4°C
caspasa 8	Cell Signaling	4927	1/1.000	O/N, 4°C
caspasa 9	stressgen	AAP-109	1/1.000	O/N, 4°C
caspase 3 (8G10)	Cell Signaling	9665	1/1.000	O/N, 4°C
dimetil H3 K4	Upsate	07-030	1/1.000	O/N, 4°C
dimetil H3 K9	Upsate	07-441	1/1.000	O/N, 4°C
ERK1 (K23) (rabbit)	Santa Cruz	sc-94	1/1.000	O/N, 4°C
ERK1/2 (L34F12)	Cell Signaling	4696	1/1.000	O/N, 4°C
Flag	Sigma	F-7425	2,5 µg/µL	2h, TA
Golgin	molecular probes	A-21270	1/500	2h, TA
HA.11	Covance	MMS-101	1/1.000	1h, T.A.
Histona H3	Cell Signaling	9715	1/1.000	O/N, 4°C
H-Ras (Y132)	abcam	ab32417	1/1.000	O/N, 4°C
Ig G conejo	GE Healthcare UK	NA934V	1/5.000	1h, T.A.
Ig G conejo	Li-Cor	926-32221	1/5.000	1h, T.A.
Ig G ratón	GE Healthcare UK	NA9310V	1/5.000	1h, T.A.
Ig G ratón	Li-Cor	926-32210	1/5.000	1h, T.A.
K-Ras (F234)	Santa Cruz	sc-30	1/1.000	O/N, 4°C
MEK total	Cell Signaling	9122	1/1.000	O/N, 4°C
N-Ras (F155)	Santa Cruz	sc-31	1/1.000	O/N, 4°C
p c Raf (ser 338)	Cell Signaling	9427	1/1.000	O/N, 4°C
p ERK (thr202/tyr204)	Cell Signaling	9101	1/1.000	O/N, 4°C
p JNK (thr183/tyr185)	Cell Signaling	9251	1/1.000	O/N, 4°C
p MEK (ser 217/221)	Cell Signaling	9121	1/1.000	O/N, 4°C
p p38 (thr180/tyr182)	Cell Signaling	9211	1/1.000	O/N, 4°C
PARP	Cell Signaling	9542	1/1.000	O/N, 4°C
PDI (H160)	Santa Cruz	sc-20132	1/200	2h, TA
Ras	BD Biosciences	610002	1/300	O/N, 4°C
Ras GRF2	BD Biosciences	R66120	1/1.000	O/N, 4°C
trimetil K20 H4	Upsate	07-463	1/1.000	O/N, 4°C

Plásmidos. Los plásmidos pCEFL-KZ-HA, pCEFL-KZ-AU5, pCEFL-KZ-HA-H-Ras-wt, pCEFL-KZ-AU5-H-Ras-wt, pCEFL-KZ-HA-K-Ras4B-wt, pCEFL-KZ-AU5-K-Ras4B-wt, pCEFL-KZ-HA-N-Ras-wt, pCEFL-KZ-AU5-N-Ras-wt, pCEFL-KZ-HA-H-Ras-C118S, pCEFL-KZ-HA-H-Ras-C184S, pCEFL-KZ-HA-K-Ras C118S, pCEFL-KZ-HA-N-Ras C118S, pGEX-2T-GST-Raf-RBD, pCEFL-KZ-HA-H-Ras-N17, pCEFL-KZ-HA-ERK2, pCEFL-KZ-HA-JNK y pCEFL-KZ-HA-p38, pRL-TK, pcDNAIII-Gal4-Elk-1, pGal4-luc ya han sido descritos (Ibiza et al., 2008; Jorge et al., 2002; Marinissen et al., 1999;

Oliva et al., 2003; Oliva et al., 2004; Taylor and Shalloway, 1996; Zarich et al., 2000; Zohar et al., 1998).

Las plásmidos de Ras dirigidos a retículo endoplásmico (pCEFL-M1-H-RasSS), aparato de Golgi (pCEFL-KDEL-H-RasSS), membrana plasmática desordenada (pCEFL-CD8-H-RasSS) y balsas lipídicas (pCEFL-LCK-H-RasSS) han sido cedidos amablemente por el Dr. Piero Crespo (Matallanas et al., 2006).

Los plásmidos pEGFP-H-Ras wt, pEGFP-H-Ras C118S, pEGFP-H-Ras C184S, se obtuvieron subclonando a partir de pCEFL-H-Ras wt, pCEFL-H-Ras C118S, pCEFL-H-Ras C184S digeridos con las enzimas de restricción Bam HI y Xba I, en el vector pEGFP-C1 (Clontech, PT3028-5) digerido previamente con las enzimas Bam HI y Xba I.

El plásmido pECFP-H-Ras-wt se obtuvo mediante subclonaje a partir de pCEFL-KZ-HA-H-Ras wt digerido con las enzimas de restricción Bam HI y Xba I, el cual se insertó entre los sitios Bgl II y Xba I del vector pECFP-C1 (Clontech, PT3489-5).

La construcción pEYFP-Raf-RBD, se obtuvo a partir del plásmido pGEX-GST-Raf-RBD, por digestión con Bgl II-EcoRI y subclonaje entre los sitios Bgl II-EcoR I de pEYFP-C1 (Clontech, PT3491-5).

El plásmido GAL4-CBP ha sido cedido amablemente por la Dra. Marian Martínez Balbás (Martinez-Balbas et al., 1998).

Transfecciones transitorias. Se realizaron con el agente JetPel (Genycell, #101-10) según el manual de la compañía. Las células PC12 se transfectaron con Lipofectamina 2000 (Invitrogen, 11668-019) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se transfectaron 6 µg (por placa de 100mm) de las construcciones pCEFL-M1-H-RasSS, pCEFL-KDEL-H-RasSS, pCEFL-CD8-H-RasSS, pCEFL-LCK-H-RasSS, pCEFL-KZ-HA-K-Ras4B-wt. Del resto de las construcciones se transfectaron 4 µg por placa de 100mm.

Western Blot (Inmunoblot). Las células se lisaron a 4°C, en rotación, con tampón MLB: 25 mM HEPES pH 7,5, 1% Tritón X-100, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM Na₃VO₄, 25 mM NaF, 1 mM PMSF, y 10 µg/ml de leupeptina, aprotinina, pepstatin A e inhibidor de tripsina. En los experimentos en los que se emplearon construcciones de Ras dirigidas a endomembranas, el buffer MLB se suplementó con 2mM CHAPs. En los ensayos de análisis de caspasas, el buffer MLB se suplementó con 1% DOC, 1% NP-40, 0.1% SDS y 2mM CHAPs. Una vez lisadas, se centrifugaron

a 6.000 rpm y se determinó la concentración de proteína en el sobrenadante utilizando el ensayo "Bio-Rad protein assay" (Bio-Rad). Posteriormente se añadió al sobrenadante tampón SB (15 ml SDS 20%; 15 ml 100% glicerol; 12 ml 1M Tris-HCl pH 7,5; 0,15 g azul bromofenol). Las proteínas se separaron por SDS/PAGE, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad) y se incubaron con los anticuerpos correspondientes. Los inmunoblots se revelaron por quimioluminiscencia (ECL, Amersham) o mediante el sistema de imagen de infrarrojos Odyssey (Li-Cor).

La cuantificación de la intensidad de las bandas se hizo utilizando el programa "PCBAS" para los WB revelados por quimioluminiscencia, y con el programa informático "Odyssey V3.0" en el caso de los WB revelados con infrarrojos.

Análisis de la interacción entre cyPGs y H-Ras *in vitro*. La proteína H-Ras recombinante a una concentración final de 5 μ M se incubó en el buffer 20 mM Tris-HCl pH 7,0, 45 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0,1 mM DTT y 1,4 % glicerol. Las cyPGs se resuspendieron en DMSO a una concentración final de 50 μ M. Después de 2 h de incubación a 4°C, las muestras se purificaron por ZipTip C18 antes o después de la digestión con tripsina a 37°C durante 4 h. El análisis por espectrometría de masas (EM) MALDI-TOF de la proteína H-Ras intacta y de los péptidos tripticos se realizó como se describió previamente (Perez-Sala et al., 2003). Para las proteínas intactas Ras, la matriz utilizada fue una solución saturada de ácido sinapínico en acetonitrilo:agua (1:2) con 0,1 % de ácido trifluoroacético (TFA). Debido a la diferencia de masa entre la matriz (224 Da) y las cyPGs utilizadas (300 Da), la interferencia de los aductos matriz-cyPGs con los de Ras-cyPGs era despreciable. El estándar de calibración "Protein Calibration Standard II" (Bruker Daltonics) se usó para la calibración externa y las muestras se analizaron en modo lineal. Para el análisis de los péptidos tripticos la matriz se saturó con una solución de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico en acetonitrilo:agua (2:1) con 0,1 % TFA, la muestra de calibración contenía angiotensina (m/z 1046,5), corticotropina (m/z 2465,2) y la matriz (ácido α -ciano-4-hidroxicinámico m/z 379) y las muestras fueron analizadas en modo reflectrón. Los espectros fueron procesados en un BIFLEX III time-of-flight (Bruker-Franzen Analytik) operado en modo positivo. El análisis de EM-EM MALDI-TOF de las proteínas seleccionadas se realizó con un espectrómetro de masas MALDI-tandem time of flight 4700 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems) en la Unidad Proteómica del Parque Científico de Madrid. Los espectros se confirmaron cotejándolos con las bases de datos Mascot (Matrix Science, Londres) y BLAST. La probabilidad de los resultados basados en MOWSE, se calcularon como $-10 \times \log(P)$, donde P es la

probabilidad de que la concordancia obtenida sea un evento casual. Se consideraron significativos cuando $P < 0,05$.

Marcaje de H, K y N-Ras con PGA₁ biotinilada. El marcaje con biotina de cyPGs y la obtención de extractos celulares ha sido descrito previamente (Oliva et al., 2003; Pérez-Sala et al., 2003). Extractos celulares de células COS1, transfectadas o no con las isoformas de Ras, fueron incubadas con 30 μ M biotina-PGA₁ o 3 μ M biotina-15dPGJ₂ 2h en medio sin suero. Las células se lisaron en 50 mM Tris-HCl pH 7,7, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 0,1 mM 2-mercaptoetanol y 0,5 % SDS con 2 μ g/ml de leupeptina, aprotinina y pepstatina A y 1,3 mM ABMSF. La incorporación de cyPGs biotiniladas se evaluó por inmunoblot con estreptavidina-HRP.

Estimulación con PGA₁ y NO. Las células se plaquearon subconfluentes el día antes de estimular, o el día previo a la transfección. 24h postransfección se pusieron en medio sin suero durante 18h. Posteriormente se estimularon con 5ng/mL de FGF, 100ng/ml NGF o 10ng/ml de EGF como controles positivos. La estimulación con PGA₁ se hizo a la concentración mínima que produce fosforilación de ERK: 10 μ M para NIH3T3 y HeLa y 30 μ M para los MEFs y células CH7C17. Como donante de óxido nítrico se utilizó GSNO a una concentración de 500 μ M o 1mM DEA-NO. 15dPGJ₂ se empleó a 3 μ M. La estimulaciones se realizaron en DMEM complementado con 10mM Hepes, a pH 7.4.

Ensayos de detección de Ras activado. Estos ensayos ya han sido descritos previamente (Taylor y Shalloway, 1996). La proteína GST-Raf-RBD (Glutation-S-Transferasa-dominio de unión a Ras de la proteína Raf-1) se purificó con glutation-sepharosa (Amersham) a partir de extractos de la cepa E. coli BL21 transformadas con el plásmido pGEX-2T-GST-Raf-RBD (Taylor y Shalloway, 1996). Las células eucariotas usadas para el ensayo, después de ser privadas de suero durante 18 h, fueron estimuladas con los agonistas correspondientes. Las células se lisaron en tampón MLB. Una alícuota de los sobrenadantes se guardó con buffer de Lammeli y el resto se incubó con 20 μ g de GST-Raf-RBD unida a la resina de glutation-sepharosa, durante 1 h a 4°C, en rotación. Tanto los sobrenadantes, como la proteína unida a GST-Raf-RBD se analizaron por Western Blot (utilizándose para analizar los niveles totales de proteína y Ras activado, respectivamente)

Ensayos de detección de Ras activado *in vitro*. Se incubó K-Ras 4B recombinante con 20 μ M PGA₁ durante 30 minutos a RT, en tampón MLB. Se añadió 10 μ g de GST-Raf-RBD-sepharosa al 50% en MLB, y se incubó con agitación suave a 4°C, 30 minutos. Después se lavó 3 veces con MLB frío y se añadió SB para realizar el WB.

Ensayos de actividad transcripcional. Se realizaron ensayos de luciferasa para medir la activación transcripcional de CBP y ELK1 en respuesta a la estimulación con GSNO. Para el análisis de CBP, se transfectaron células NIH3T3 en placas de 60mm, con 2 μ g de GAL4-CBP, 3 μ g de TATA-Gal4-Luc, y 1 μ g pRL-TK. En el caso de ELK1, la transfección se realizó en placas de 6 pocillos, con 333ng de TATA-Gal4-Luc, 100ng de pRL-TK, y 16.6ng de GAL4-ELK1. La estimulación con GSNO se realizó durante 1 hora, y posteriormente se incubaron las células durante 4 horas en medio de crecimiento normal, sin GSNO. Tras la estimulación, se lisaron las células y se procedió según el manual de instrucciones de "Dual-Luciferase Kit" (Promega). La luz emitida por las luciferasas Photinus y Renilla se cuantificó en el luminómetro OPTOCOMP 1 (MGM Instruments). La actividad luciferasa Renilla presente en cada extracto se utilizó para la normalización de la señal de luciferasa Photinus.

Ensayos de proliferación. Para estos experimentos se sembraron 150.000 células NIH3T3 en placas de 60 mm. 16h después se privaron de suero durante 18h. Las células se estimularon y se recogieron a las 24, 48 y 72h pos-estimulación. Para determinar las células muertas, se tiñó la muestra con azul tripán y se hizo el conteo en una cámara Neubauer. De cada muestra se hicieron duplicados, y se contaron dos veces cada duplicado. Se realizaron tres experimentos, con duplicados.

Experimentos de diferenciación. Se plaquearon 250.000 células PC12 en placas de 35mm cubiertas con colágeno. Se estimularon con 100 ng/ml NGF \pm PGA₁ 10 μ M a las 24 y 48h y se midieron las neuritas en relación al soma celular. Se consideró un neurita como una extensión del cuerpo celular equivalente o mayor que 1.5 veces el diámetro del soma. La medida de la longitud y cuantificación del número de neuritas se hizo en tres experimentos independientes, usando la aplicación "Neuron J" del programa "Image J" (<http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>).

Citometría de flujo. El protocolo de análisis de muerte celular ha sido descrito previamente (Lassus and Hibner, 1998). Las células se estimularon al día siguiente de

plaquearse y 5h después se tripsinizaron y se resuspendieron en 500 μ l de buffer de anexina: 0,1M Hepes pH 7,5, 1,4 M NaCl, 25mM CaCl_2 . Se incubaron con 5 μ l de anexina V-FITC y 600 ng/ml de ioduro de propidio en oscuridad y a temperatura ambiente durante 15 minutos.

En los estudios de contribución de Ras en la apoptosis por PGA_1 , se cotransfectaron los plásmidos de Ras con el vector pEGFP (ratio 5:1). Se siguió el mismo protocolo mencionado anteriormente, tiñendo las células con anexina V-DY634 y ioduro de propidio. Se seleccionaron y analizaron las células GFP positivas.

El protocolo de marcaje de células con ioduro de propidio para análisis de ciclo celular y población sub G0/G1 ha sido descrito previamente (Crissman et al., 1990). Las poblaciones se analizaron con el programa ModFit LT TM (BD).

Todas las muestras se analizaron en un citómetro FACScalibur (BD). La significación estadística se estimó con la t de student. Se consideró significativo un valor de $p < 0.05$.

Inmunofluorescencia y microscopía confocal. Para la detección de las proteínas pCFP-Ras y YFP-RBD, las células CH7C17 se plaquearon en cubres cubiertos con poli-lisina durante 10 minutos a 37°C en cámaras húmedas de incubación, y las células NIH3T3 se plaqueron sobre cubres redondos. Se estimularon y posteriormente se fijaron durante 10 minutos con 2% paraformaldehído en PBS, a temperatura ambiente, se lavaron con PBS y se montaron con Prolong Gold Antifade Reagent (Invitrogen, P36930).

Para la tinción de compartimentos celulares, las células se fijaron como se ha descrito anteriormente, se permeabilizaron durante 5 minutos con metanol, se lavaron con PBS y se bloquearon 20 minutos con 5% BSA en PBS. Posteriormente se incubaron con los anticuerpos específicos. La tinción de núcleos con DAPI se realizó sumergiendo los cubres en 1 μ g/ml DAPI en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron tres veces durante 10 minutos, con PBS.

Las imágenes se adquirieron con un Microscopio Láser Confocal Spectral (CLSM) Leica TCS SP2-AOBS (Servicio de Microscopía Confocal del Centro de Investigaciones Biológicas de Madrid). Se tomaron secciones de 0.2 μ m para estudiar colocalización.

La cuantificación de la intensidad de señal de los experimentos de colocalización de H-Ras CFP y Raf-RBD-YFP se realizó trazando un área en regiones de endomembrana o membrana plasmática. De esta área, se calculó la intensidad de señal correspondiente a Raf-RBD-YFP, y se le restó la intensidad de esta señal de un

área idéntica en el citoplasma. Este valor se dividió por la diferencia de la intensidad de señal de H-Ras CFP en el área seleccionada de endomembrana o membrana plasmática, menos la intensidad de CFP en el citoplasma. Se contaron 100 células.

Extracción ácida de histonas por diálisis. Las células se lisaron en buffer de lisis formado por 10mM HEPES pH 7.9, 1.5mM MgCl₂, 10mM KCl, 1.5mM PMSF, 0.5mM DTT, 0.33μM tricostatina A. Se resuspendieron en HCl a concentración 0.2 M, se centrifugó y dializó dos veces en ácido acético 0.1 M durante 2 horas. Posteriormente se dializó tres veces en agua, durante 1, 3 y 18 horas respectivamente, se resuspendieron en buffer de carga y se analizaron por WB (Murray, 1966).

Análisis estadístico. Los ensayos de diferenciación se analizaron mediante el test de comparación de porcentajes poblacionales. En estos estudios, el número de muestras era superior a 30. Se consideró significativo un valor de $p < 0.01$

El análisis estadístico de la cuantificación de la unión de PGA₁ a Ras *in vitro* se realizó mediante el test t de student.

El análisis estadístico de la cuantificación de la colocalización de H-Ras CFP y Raf-RD YFP se hizo mediante ANOVA, con la corrección Newman-Keul's.

El resto de los análisis, en los cuales la comparación se realizó entre los promedios de varias condiciones experimentales en un número comprendido entre tres y cinco experimentos, se realizaron mediante el test no paramétrico U Mann-Whitney, considerándose estadísticamente significativos si $p < 0.05$. Además de este test, aplicamos el test t de student por tratarse del más comúnmente utilizado en la comunidad científica, resultando la misma significación estadística que el test no paramétrico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. PGA₁ SE UNE Y ACTIVA A LAS PROTEÍNAS RAS

1.1 PGA₁ modifica a H-Ras *in vitro*

En nuestro laboratorio y en colaboración con los grupos de los Drs. L. Boscá y D. Pérez-Sala demostramos que la prostaglandina ciclotepentenona 15dPGJ₂ se une y activa a H-Ras originando activación de ERK, avance en el ciclo celular, e inhibición de la apoptosis por DMBA (Millan et al., 2006; Oliva et al., 2003). Por ello, nos planteamos investigar si PGA₁, otra prostaglandina ciclopentenona de estructura similar a 15dPGJ₂, modifica a las proteínas Ras.

En primer lugar, analizamos si se produce unión directa *in vitro* entre H-Ras y PGA₁. Estos experimentos se hicieron conjuntamente con Carlota A. García y en colaboración con el grupo de la Dra Pérez-Sala (CIB, CSIC). Incubamos proteína H-Ras recombinante con PGA₁ y analizamos mediante espectrometría de masas (EM) MALDI-TOF si se produce esta interacción entre H-Ras y PGA₁. Los valores de m/z obtenidos son compatibles con moléculas formadas por aductos entre PGA₁ y Ras (Figura 12), siendo los valores 21640, 21978 y 22318, indicativos de que esta unión se produce con una estequiometría PGA₁:Ras de 1:1, 2:1 y 3:1.

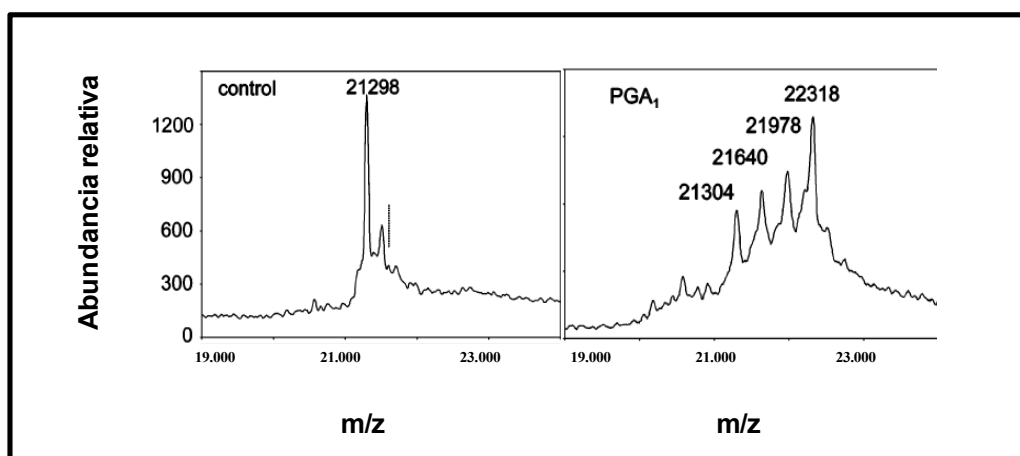


Figura 12. Interacción de PGA₁ con proteína H-Ras. Análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF. La adición de una molécula de PGA₁ (masa 336.5) a H-Ras (masa 21298), resulta en el pico de m/z 21.640. Los espectros mostrados son representativos de tres ensayos. La línea del control indica la posición en la que aparece el aducto entre Ras y la prostaglandina ciclopentenona 15dPGJ₂.

Con el objetivo de determinar qué residuos de H-Ras están implicados en la interacción, se incubó H-Ras con PGA₁, se digirió con tripsina, y se analizó mediante la

técnica EM MALDI-TOF (Figura 13A). Entre los péptidos trípticos obtenidos, encontramos ratios m/z compatibles con péptidos modificados en la cisteína 118 (localizada en el motivo G4 de unión a GTP/GDP), 181 y/o 184 (residuos de la región C-terminal de H-Ras) (Figura 13B). El péptido más abundante es el que resulta de la modificación en el residuo 118 (Figura 13C). Comprobamos la identidad de este péptido secuenciándolo mediante la técnica EM MALDI-TOF-TOF (Figura 14). El resultado obtenido confirmó que contiene la secuencia CDLAAR, correspondiente a la región que incluye la cisteína 118.

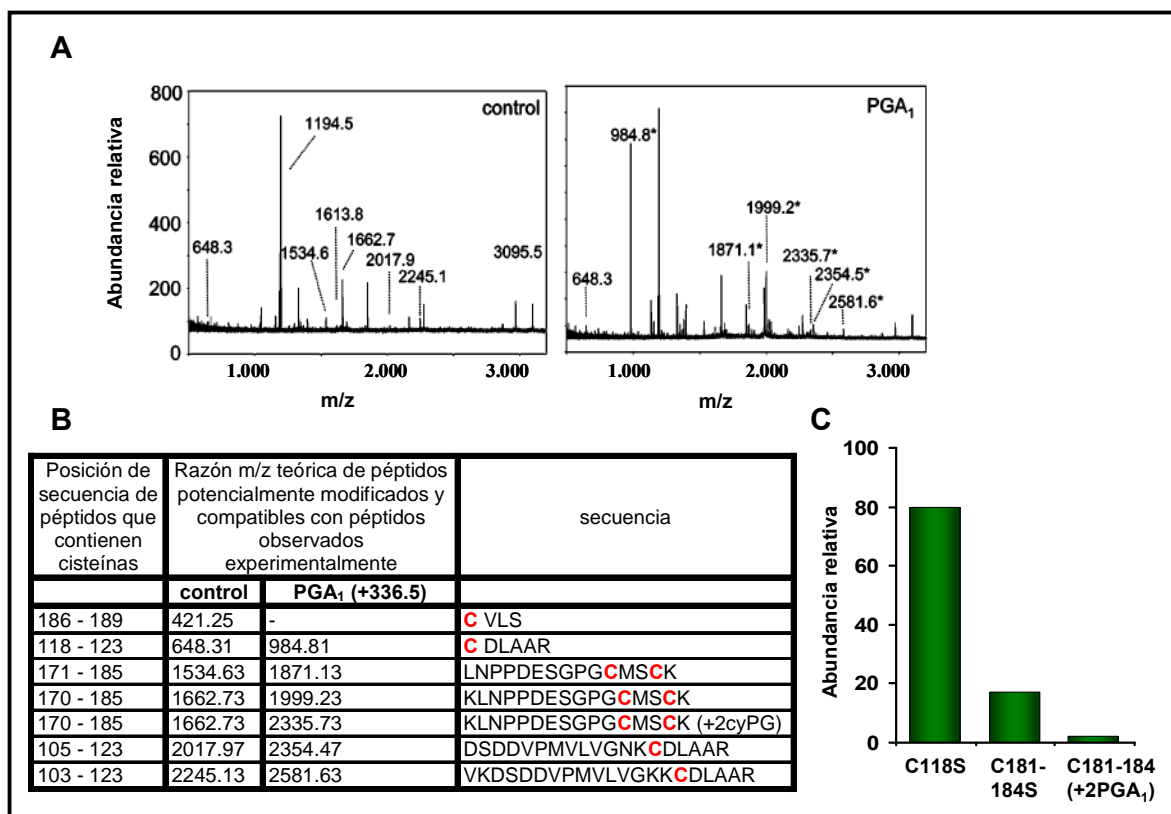


Figura 13. Análisis por EM MALDI-TOF de H-Ras modificada por PGA₁ y digerida con tripsina. A) Espectro con los valores mono-isotópicos m/z de los péptidos detectados. Los péptidos que presuntamente están modificados aparecen señalados con asteriscos. B) Tabla resumen de m/z teóricos compatibles con péptidos encontrados experimentalmente, secuencia y posición en H-Ras. Las cisteínas (dianas de unión de PGA₁) están resaltadas en color rojo, indicando la posible localización de la unión de PGA₁. C) Abundancia relativa de los péptidos modificados por PGA₁. +2cyPG: m/z compatible con la unión de dos moléculas de PGA₁.

Estos resultados sugieren que PGA₁ se une a la proteína H-Ras *in vitro* y que esta unión ocurre mayoritariamente en la cisteína 118. Aunque este residuo está localizado en el motivo de unión a nucleótido, no forma contactos específicos con el nucleótido de guanina, ni con ninguno de los aminoácidos implicados en la unión a GTP/GDP (Brunger et al., 1990; Wittinghofer et al., 1991). Así, el mutante H-Ras C118S no difiere de Ras wt ni en su estructura terciaria, ni en el intercambio de

nucleótidos (Mott et al., 1997). Estas características sugerían que la unión de PGA_1 a este residuo no causaría modificaciones estructurales que impidiesen la funcionalidad de H-Ras. Además, esta misma cisteína ha sido descrita como residuo de interacción de H-Ras con el óxido nítrico y ROS (Deora et al., 2000).

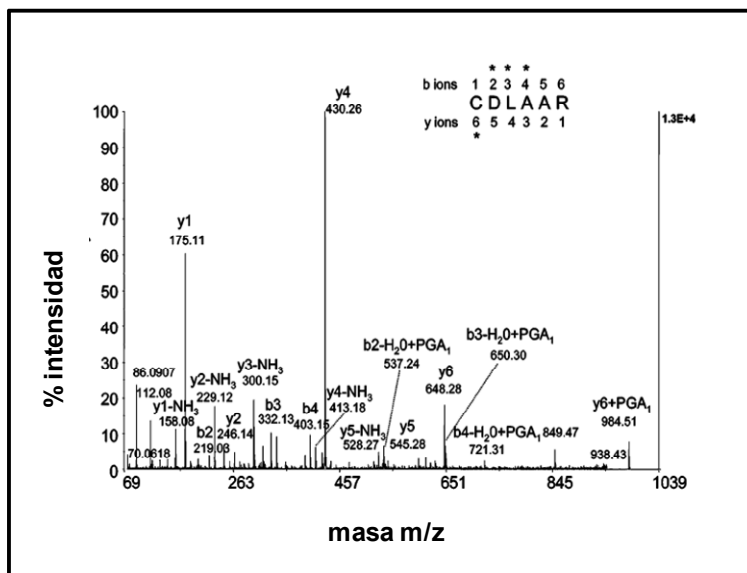


Figura 14. Análisis por EM MALDI-TOF-TOF del péptido triptico más abundante. El péptido de m/z 948.8, se corresponde con el péptido triptico CDLAAR, que contiene la cisteína 118 (m/z 648.3), más una molécula de PGA_1 . El incremento en masa de 336.5 se observó en los iones $b2\text{-H}_2\text{O}$, $b3\text{-H}_2\text{O}$, $b4\text{-H}_2\text{O}$, y $y6$, y es indicativo de que la modificación ocurre en el residuo 118.

1.2 PGA_1 modifica a H-Ras *in vivo*

Nos planteamos si la interacción entre PGA_1 y H-Ras, se produce también *in vivo*. Para analizarlo, empleamos PGA_1 biotinilada. Dado que la biotina es estructuralmente voluminosa y su unión se produce a través del grupo carboxilo de la prostaglandina, podría afectar a la interacción con H-Ras. Por ello, analizamos si PGA_1 biotinilada se une a H-Ras *in vitro*, para lo cual realizamos ensayos de EM-MALDI-TOF (Figura 15A) y WB (Figura 15B). PGA_1 -biotinilada se une a H-Ras de forma más débil que la prostaglandina sin modificar y la abundancia relativa de los complejos PGA_1 no biotinilada-Ras se incrementa a medida que aumenta el ratio entre PGA_1 -Ras, contrariamente a lo que ocurre con PGA_1 biotinilada (Figura 12 frente a Figura 15A). Estas diferencias nos sugerían que PGA_1 biotinilada se une a Ras, pero difiere en la afinidad por los residuos de interacción respecto a la prostaglandina sin modificar.

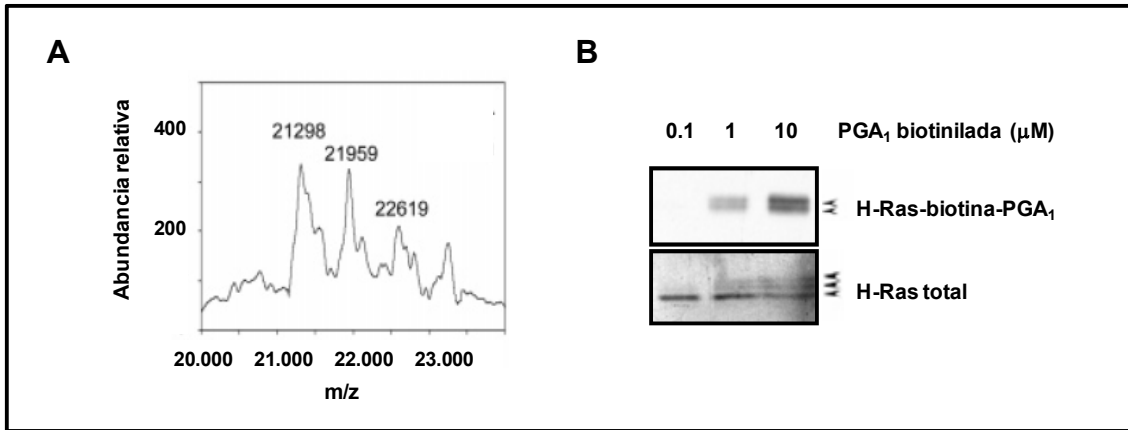


Figura 15. Modificación *in vitro* de H-Ras por PGA₁ biotinilada. A) Espectro resultante de EM MALDI-TOF. B) WB en el que se muestra la modificación *in vitro* de H-Ras por PGA₁ biotinilada. Panel superior: revelado con HRP-streptavidina. Panel inferior: tinción con Coomassie. Las dos flechas superiores señalan a H-Ras modificado, y la flecha inferior del panel inferior, a Ras sin modificar. Las figuras son representativas de tres ensayos con resultados similares.

Analizamos la unión de PGA₁ *in vivo*, estimulando células Cos7 que sobre-expresan H-Ras con PGA₁ biotinilada, y analizando los resultados por WB. Como se muestra (Figura 16A), se produce unión entre H-Ras y PGA₁ *in vivo*.

Nuestros resultados *in vitro* indican que la interacción ocurre en las posiciones 118 y 184, por lo que analizamos si estos mismos residuos se modifican también *in vivo*. Para ello utilizamos células Cos7 transfectadas con vectores de expresión de H-Ras wt, o mutantes en los que las cisteínas 118 y 184 se modificaron a serina y las tratamos con PGA₁ biotinilada. Encontramos que PGA₁ se une *in vivo* tanto a H-Ras C118S, como a H-Ras C184S (Figura 16B), pero la unión con el mutante H-Ras C184S es más débil que con el mutante H-Ras C118S (Figura 16C). De este resultado podría deducirse que *in vivo*, se produce mayor unión al residuo 184 de Ras, difiriendo de los resultados encontrados *in vitro*, en los cuales la modificación mayoritaria de la prostaglandina ocurre en la posición 118. Sin embargo, la unión de PGA₁ biotinilada presenta diferencias en la afinidad de unión a los residuos de interacción con Ras respecto a PGA₁ no biotinilada, por lo que nuestros resultados de unión *in vivo* son cualitativos, y sugieren que PGA₁ se une a H-Ras *in vivo* por su unión a ambas cisteínas, ya que mediante este procedimiento no podemos determinar cuantitativamente la afinidad por cada uno de ellos.

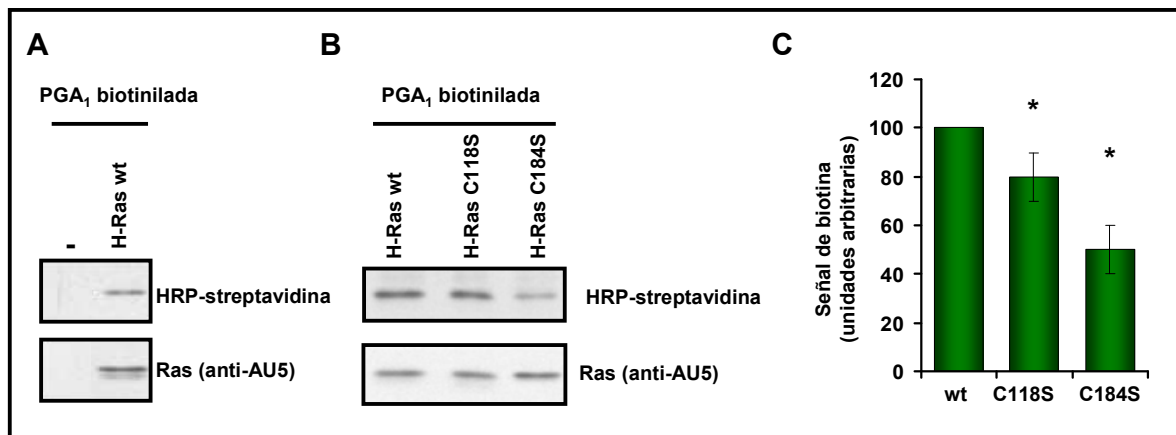


Figura 16. Modificación *in vivo* de H-Ras por PGA₁ biotinilada. A) WB de células Cos7 transfectadas transitoriamente con vector pCEFL vacío (-) o pCEFL-AU5-H-Ras wt y estimuladas con 30 μ M PGA₁-biotina. Experimento representativo de tres ensayos independientes. B) WB de células transfectadas transitoriamente con pCEFL-AU5-H-Ras wt, pCEFL-AU5-H-Ras C118S y pCEFL-AU5-H-Ras C184S, y estimuladas con 30 μ M PGA₁ biotinilada. WB representativo de tres experimentos independientes. C) Cuantificación del WB del panel B. Se representa el promedio \pm la desviación estándar. * $p < 0.05$, comparación con H-Ras wt. Resultados de tres ensayos independientes realizados de igual forma.

1.3 PGA₁ y activación de H-Ras y mutantes

La unión directa del óxido nítrico y ROS a la cisteína 118 de la proteína H-Ras, origina cambios estructurales que conllevan la liberación del GDP y unión de GTP, provocando la estimulación de Ras (Lander et al., 1995a). Por ello, nos planteamos analizar si la unión de PGA₁ induce la activación de Ras. Para analizarlo realizamos ensayos de detección de H-Ras activado en células HeLa que sobre-expresan H-Ras wt o los mutantes en los residuos de interacción con PGA₁ (Figura 17). Ambos mutantes son funcionales, dado que se activan por EGF al igual que la versión normal, como se muestra en la Figura 17. Tras la estimulación con PGA₁, se produce la activación de H-Ras wt a los 5 minutos. H-Ras C184S se activa más intensamente por PGA₁ que H-Ras wt. Por el contrario, el mutante H-Ras C118S apenas se activa por PGA₁. Nuestros resultados indican que PGA₁ activa a H-Ras dependiendo para ello de su unión al residuo 118.

15dPGJ₂ no activa al mutante de Ras que carece de la cisteína 184 (Figura 17), a diferencia de lo que ocurre con PGA₁, y coincidiendo con lo publicado previamente (Oliva et al., 2003). El residuo 184 se encuentra en la región hipervariable y no está presente en N- ni K-Ras, razón por la cual 15dPGJ₂ ni se une, ni activa, a estas isoformas (Oliva et al., 2003). Dado que el residuo 118 se localiza en la región común a las tres isoformas, el siguiente objetivo que nos planteamos fue analizar si PGA₁ activa también a K- y N- Ras.

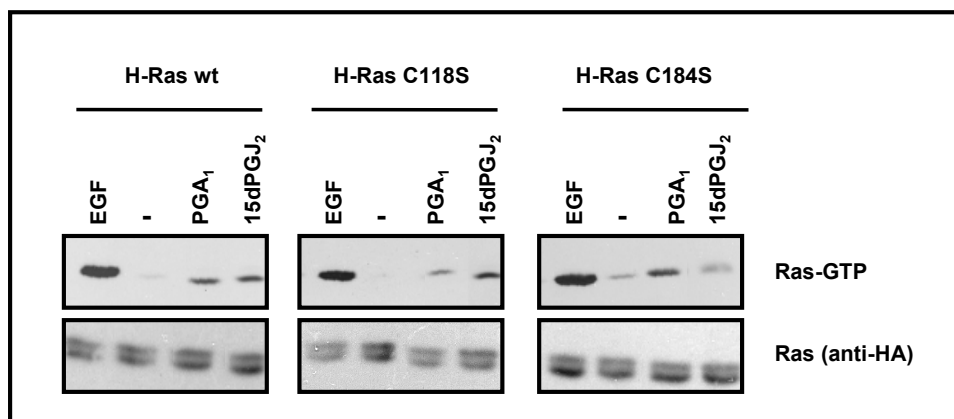


Figura 17. Activación *in vivo* de H-Ras wt y mutantes tras la estimulación con PGA₁ y 15dPGJ₂. Ensayo de detección de Ras activado en células Hela transfectadas transitoriamente con pCEFL-HA-H-Ras-wt, pCEFL-HA-H-Ras C118S y pCEFL-HA-H-Ras C184S y estimuladas con PGA₁ 10μM. Resultados similares se obtuvieron en tres ensayos independientes realizados de igual forma.

1.4 PGA₁ se une y activa a las tres isoformas de Ras

Nuestros resultados sugieren que PGA₁ activa a H-Ras uniéndose al residuo 118 que posee en su región constante, por lo que investigamos si las otras dos isoformas de Ras, N- y K-Ras 4B también interaccionan con PGA₁ *in vivo*. Para ello, utilizamos el mismo abordaje que en el caso de H-Ras. Como se muestra en la Figura 18A, las tres isoformas unen PGA₁. La señal de K-Ras 4B es menos intensa, lo cual podría estar relacionado con el menor número de cisteínas modificables de esta isoforma en su región C-terminal.

Para analizar si las tres isoformas se activan por PGA₁, realizamos ensayos de detección de Ras activado en células que sobre-expresan H-, K- o N-Ras (Figura 18B). Así, encontramos que las tres isoformas de Ras son activadas por PGA₁. H-Ras sigue una cinética de activación ascendente, siendo mayor la activación a los 15 minutos que a los 5. Sin embargo, K-Ras se estimula más fuertemente a los 5 minutos, decayendo su activación a los 15 minutos. Por otro lado, N-Ras se activa con la misma intensidad a los 5 y 15 minutos. Estos resultados indican que PGA₁ se une y activa a las tres isoformas de Ras.

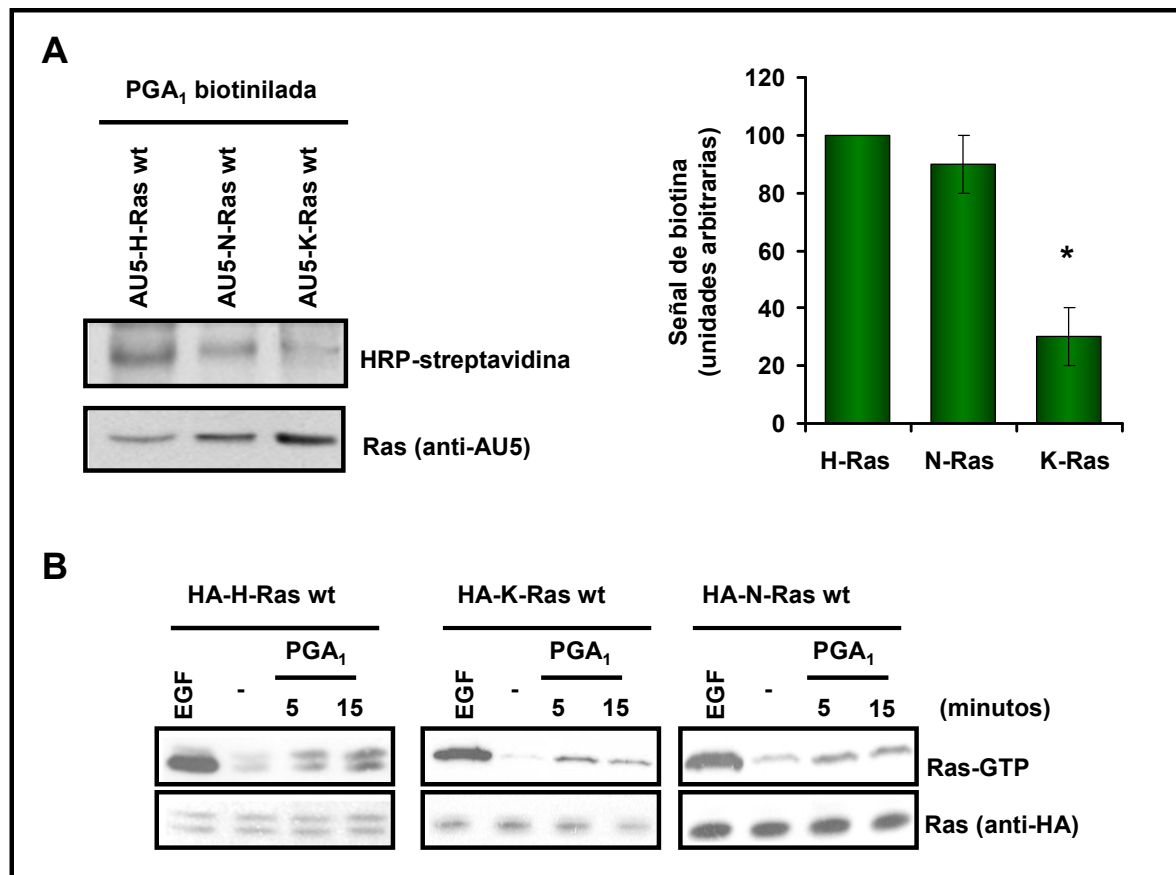


Figura 18. Unión y activación de Ras por PGA₁ *in vivo*. Células que sobreexpresan H-Ras-wt, K-Ras wt y N-Ras wt. A) Panel izquierdo: WB de células Cos7 tratadas con PGA₁ biotinilada. Panel derecho: cuantificación de la intensidad de señal detectada en el WB del panel izquierdo. Se representa el promedio \pm la desviación estándar. * $p < 0.05$, comparación con H-Ras. Los resultados mostrados son el promedio de 4 experimentos. B) Ensayos de detección de Ras activado en células HeLa tratadas con PGA₁ 10 μ M. El WB mostrado es representativo de tres experimentos.

1.5 Activación de MAPK por PGA₁

La activación de las proteínas Ras promueve la inducción de distintas vías efectoras dependiendo del tipo de estímulo y del contexto celular, como es el caso de las MAPK (Crespo and Leon, 2000). Para determinar qué MAPK se activan en respuesta a PGA₁, estimulamos células HeLa y NIH3T3 en cultivo y analizamos la activación de las MAPK ERK, JNK y p38. El tratamiento con PGA₁, produce un aumento en la fosforilación de Raf, MEK y ERK (Figura 19), indicando que la vía Raf-MEK-ERK se activa en respuesta a PGA₁.

Para determinar si Ras es el responsable de la activación de ERK por PGA₁, sobre-expresamos ERK2 y un mutante dominante negativo de Ras, Ras N17 (el cual no puede des-unir GDP, y por tanto no puede activarse), y analizamos la activación de

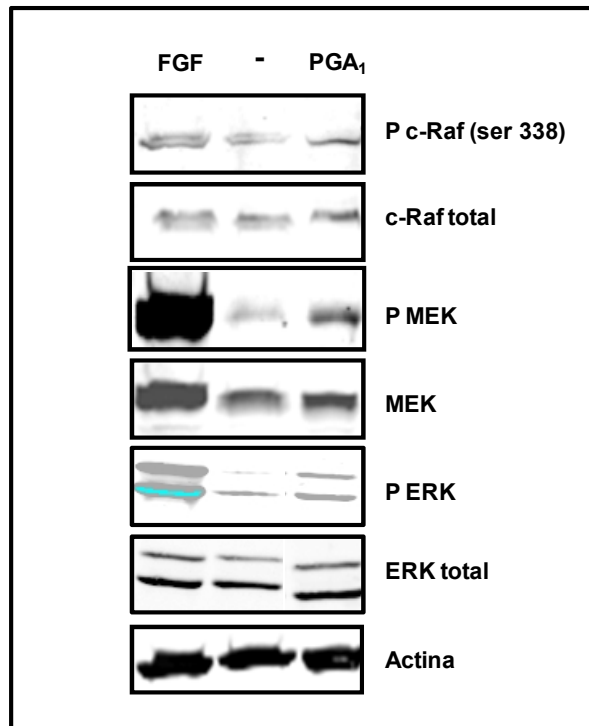


Figura 19. Activación de la vía Raf-MEK-ERK por PGA₁. WB en el que se muestra la fosforilación de c-Raf, MEK y ERK en células NIH3T3 estimuladas durante 15 minutos con PGA₁ 30 μ M. Resultados similares se obtuvieron en tres experimentos independientes.

ERK después de la estimulación con PGA₁ (Figura 20). No se produce activación de ERK cuando se bloquea la liberación del GDP unido a Ras. Este resultado sugiere que la estimulación de ERK por PGA₁ es dependiente de la señalización por Ras.

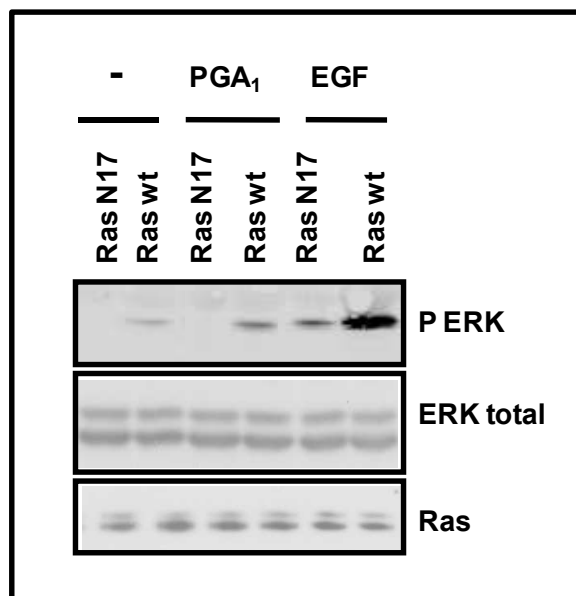


Figura 20. La estimulación de ERK por PGA₁ es dependiente de la activación de Ras. Inmunoprecipitación con anti-HA, de células HeLa transfectadas transitoriamente con pCEFL-AU5-H-Ras N17, pCEFL-AU5-H-Ras N17 y pCEFL-HA-ERK2, y estimuladas durante 15 minutos con 10 ng/mL EGF, 10 μ M PGA₁ o DMSO (-). Se muestran los niveles de Ras transfectados (anticuerpo anti-AU5). Este experimento es representativo de tres experimentos independientes.

La activación de las quinasas JNK y p38 la analizamos mediante la detección de su fosforilación por WB. No detectamos cambios en la fosforilación de JNK, ni p38 endógenos (datos no mostrados), ni mediante la sobre-expresión de estas quinasas (Figura 21).

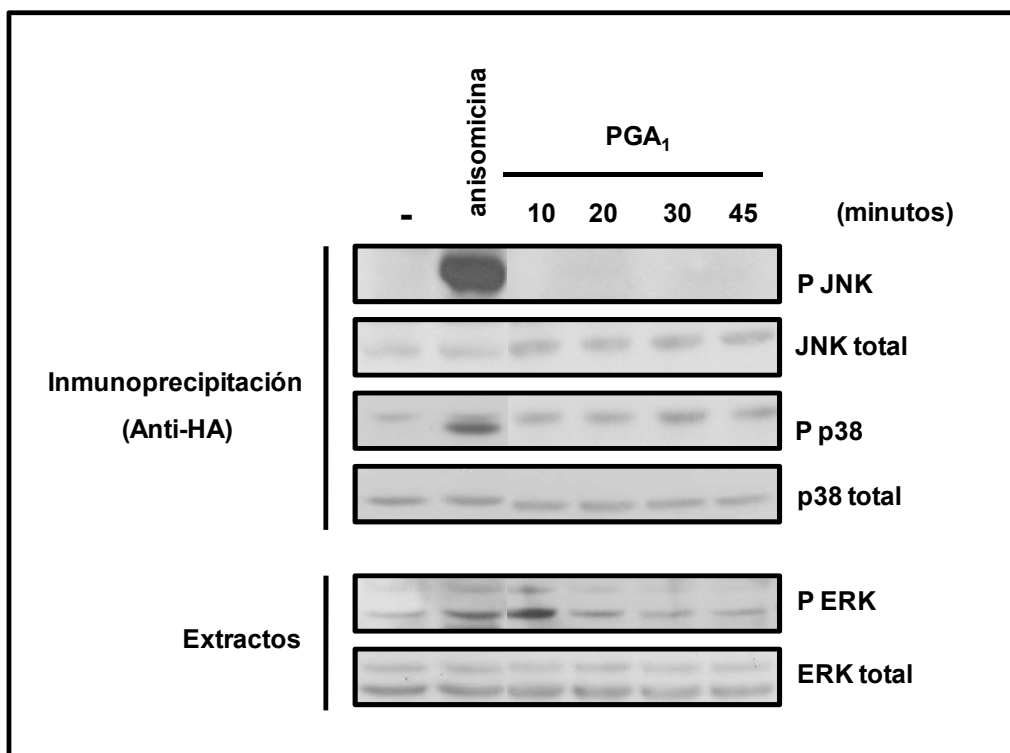


Figura 21. PGA₁ no activa a JNK, ni a p38. Se transfectó pCEFL-HA-JNK o pCEFL-HA-p38 en células HeLa. Se estimularon durante los tiempos indicados en la figura y se inmunoprecipitó con anticuerpo anti-HA. El WB del inmunoprecipitado se incubó con los anticuerpos fosfo-específicos, y posteriormente se analizaron los niveles totales de inmunoprecipitado mediante incubación con anticuerpo anti-HA. Se muestra la fosforilación y niveles endógenos de ERK como control positivo de la activación por PGA₁. Este ensayo es representativo de tres experimentos realizados en las mismas condiciones.

1.6 Modelo de activación de Ras por PGA₁

Nuestros resultados sugieren que la unión directa de PGA₁ induce la activación de las proteínas Ras. Para estudiar cómo se produce esta activación, empleamos técnicas de simulación estructural y dinámica molecular, en colaboración con el grupo del Dr. Federico Gago (Universidad de Alcalá). El modelado de esta interacción sugiere que Ras se activaría directamente por la unión de PGA₁, es decir, de forma independiente de la actuación de Ras GEFs (Figura 22). En primer lugar, la interacción de PGA₁ con la cisteína 118 (Figura 22C) disminuiría la afinidad de unión del GDP con Ras, ocasionando que el GDP se suelte. La cisteína 118 ocuparía entonces parte de la

región de unión al nucleótido (Figura 22C enfatizado con flecha), y PGA_1 se uniría a ella mediante un enlace covalente (Figura 22D). Posteriormente, el extremo carboxilo de la CyPG se acoplaría con el Mg^{2+} de Ras, impidiendo así la entrada de GTP, y desplazaría al “switch 1” a una posición similar a la de Ras-GTP: es decir, Ras- PGA_1 tendría, en lo que concierne a su región efectora, una estructura similar a la de Ras-GTP (Figura 22D frente a figura 22A y 22B), por lo que podría interaccionar con sus efectores, pero sin necesitar GTP para ello.

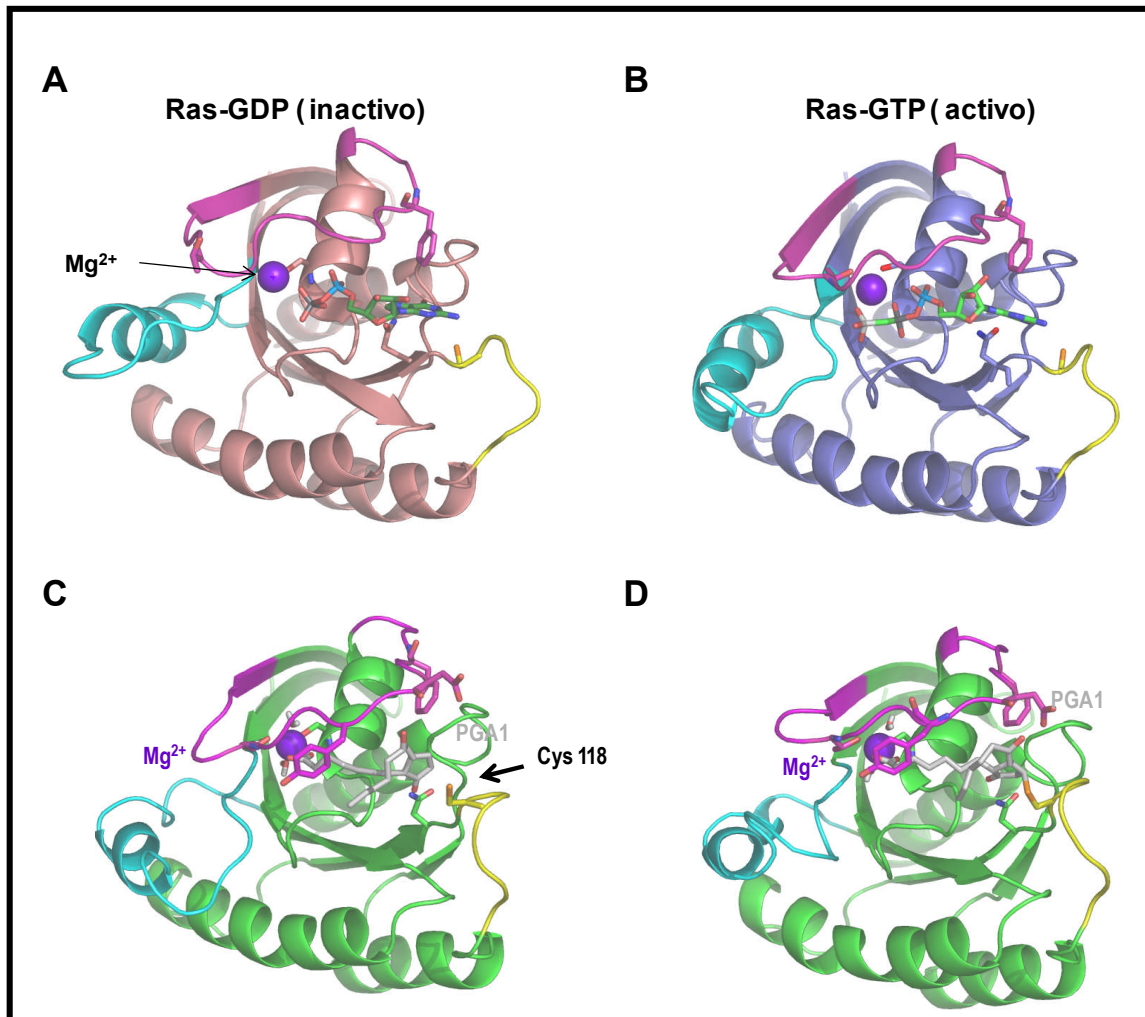


Figura 22. Conformación de Ras. A) Conformación inactiva de Ras (Ras-GDP). B) Conformación activa de Ras (Ras GTP). C) complejo precovalente entre PGA_1 y Ras. D) Complejo covalente entre PGA_1 y Ras. **Fucsia:** Switch 1. **Azul:** Switch 2. **Rosa:** Ras:GDP. **Azul oscuro:** RasGTP

Para validar este modelo, realizamos un ensayo de detección de K-Ras activado *in vitro* en el cual incubamos proteína K-Ras 4B recombinante con PGA_1 en ausencia de GTP y GDP (Figura 23). K-Ras 4B, tras ser estimulado con PGA_1 , y sin existir GTP ni GDP en el medio de incubación, se une a Raf-RBD, lo cual indica que K-

Ras 4B se activa por PGA_1 , independientemente de GTP. Hasta ahora, no se había descrito la estimulación de Ras de forma independiente de GTP, por lo que este modelo supondría un novedoso mecanismo de activación de Ras.

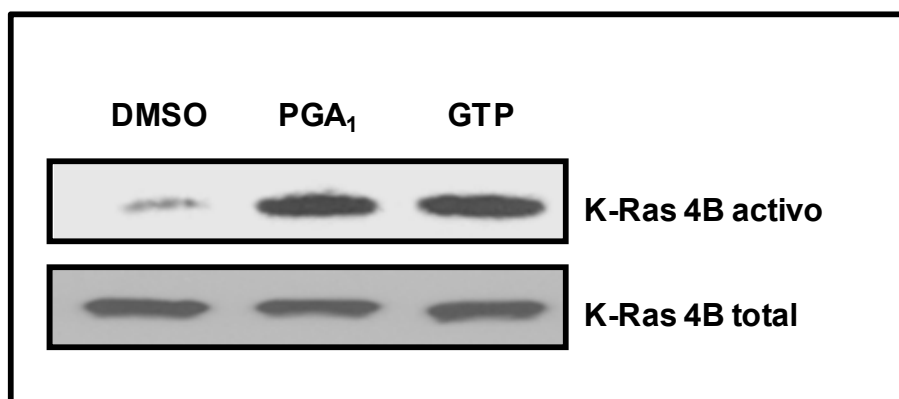


Figura 23. Tanto PGA_1 , como GTP, provocan una conformación de Ras capaz de unirse a Raf-RBD. Proteína K-Ras 4B pura, sin GTP ni GDP, se incubó con DMSO, PGA_1 o GTP. Se valoró la activación de Ras por su capacidad de unión a GST-Raf-RBD mediante ensayos de detección de Ras activado *in vitro*. Este resultado se repitió en tres experimentos independientes.

Se ha descrito que el óxido nítrico activa a H-Ras también por su unión directa a la cisteína 118, al promover un cambio electrónico en Ras que conlleva la liberación de GDP y la consecuente entrada de GTP (Heo et al., 2005). La estimulación de Ras tanto por óxido nítrico, como por PGA_1 (experimentos *in vitro*) no necesitaría la actuación de Ras GEF, difiriendo así del mecanismo clásico de activación de Ras (Heo et al., 2005). La activación de H-Ras por 15dPGJ_2 sin embargo, es dependiente de Ras-GEF (Oliva, 2002, datos no publicados). Esta diferencia podría deberse a la presencia de dobles enlaces adicionales en 15dPGJ_2 que ocasionan una conformación de sus cadenas laterales que harían que esta prostaglandina no pudiese acceder a la cisteína 118 de Ras. Además, PGA_1 posee un grupo hidroxilo en una de sus cadenas laterales que potencialmente puede formar puentes de hidrógeno. Es posible que PGA_1 , por su estructura tridimensional y por poseer un sustituyente capaz de formar puentes de hidrógeno, pueda establecer un tipo de interacciones con el motivo de unión de GTP/GDP de H-Ras que 15dPGJ_2 no puede formar.

Tanto PGA_1 , como 15dPGJ_2 , se unen a las cisteínas dianas de palmitoilación de H-Ras. Los palmitatos de H-Ras establecen interacciones distintas con los fosfolípidos de las bicapas lipídicas dependiendo de si Ras está unido a GTP o GDP (Gorfe et al., 2007; Hancock, 2006). Existen diferencias estructurales entre el palmitato y las cyPGs 15dPGJ_2 y PGA_1 : la longitud de las cadenas alifáticas laterales y la presencia de grupos polares y de un anillo en las cyPGs. El hecho de que 15dPGJ_2 y

PGA₁ se unen a H-Ras por la cisteína 184, sugiere que la orientación de H-Ras respecto a la membrana plasmática, a los Ras-GEFs y a los efectores de Ras, será diferente según la modificación lipídica, por lo que es posible que ello pueda influir en la activación de Ras.

2. ACTIVACIÓN DE RAS POR ÓXIDO NÍTRICO

La activación de Ras por óxido nítrico ha sido descrita previamente (Lander et al., 1995a). Esta molécula comparte varias características con PGA₁: activa a H-Ras al unirse directamente a ella (Heo et al., 2005), su diana de unión es la cisteína 118 (Mott et al., 1997), y se produce a altas concentraciones durante los procesos inflamatorios (Bogdan, 2001). Con el objetivo de comparar los efectos de ambas moléculas sobre las proteínas Ras y la activación de MAPK, comenzamos analizando la estimulación de las proteínas Ras por óxido nítrico en aspectos que no habían sido descritos con anterioridad.

En primer lugar analizamos la cinética de activación de Ras *in vivo* mediante ensayos de detección de Ras activado. Nuestros resultados muestran que H-Ras se activa tras 5 minutos de estimulación con el donante de óxido nítrico, GSNO, manteniéndose activo hasta los 45 minutos post-estimulación (Figura 24). Estos resultados concuerdan con los obtenidos *in vitro* por otros autores (Lander et al., 1995a).

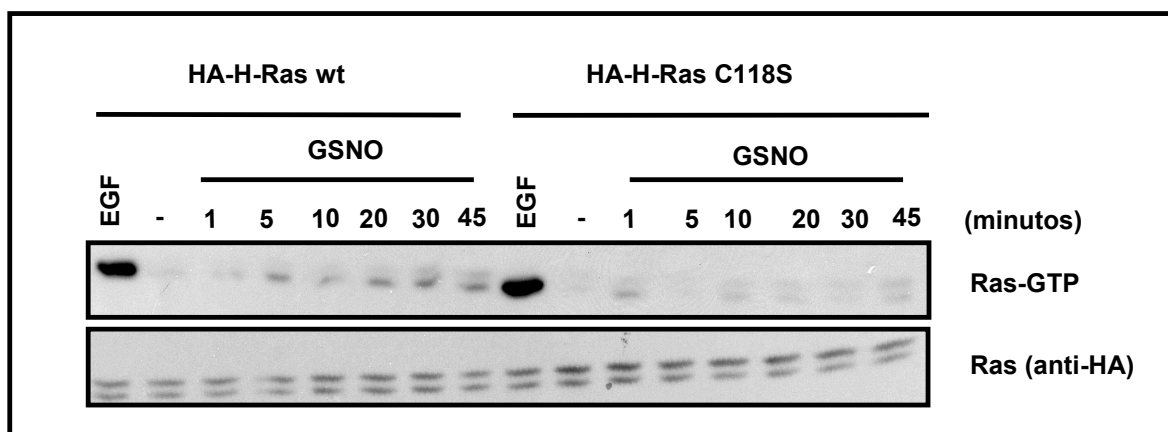


Figura 24. Cinética de activación de Ras por GSNO. Ensayo de detección de Ras activado en células Hela transfectadas transitoriamente con pCEFL-H-Ras wt o pCEFL-H-Ras C118S y estimuladas *in vivo* con GSNO 500 μ M. Se muestra un ensayo representativo de tres experimentos independientes.

La activación de H-Ras por óxido nítrico se produce a través de la interacción con la cisteína 118 de Ras (Mott et al., 1997). El mutante de Ras que carece de esta cisteína, tiene muy disminuida su activación por óxido nítrico (Figura 24) (Mott et al., 1997). Dado que esta cisteína es común a las tres isoformas, investigamos si todas ellas pueden ser activadas por óxido nítrico *in vivo*. Para ello, realizamos ensayos de detección de Ras activado. Nuestros resultados demuestran que las tres isoformas de Ras se activan por óxido nítrico (Figura 25).

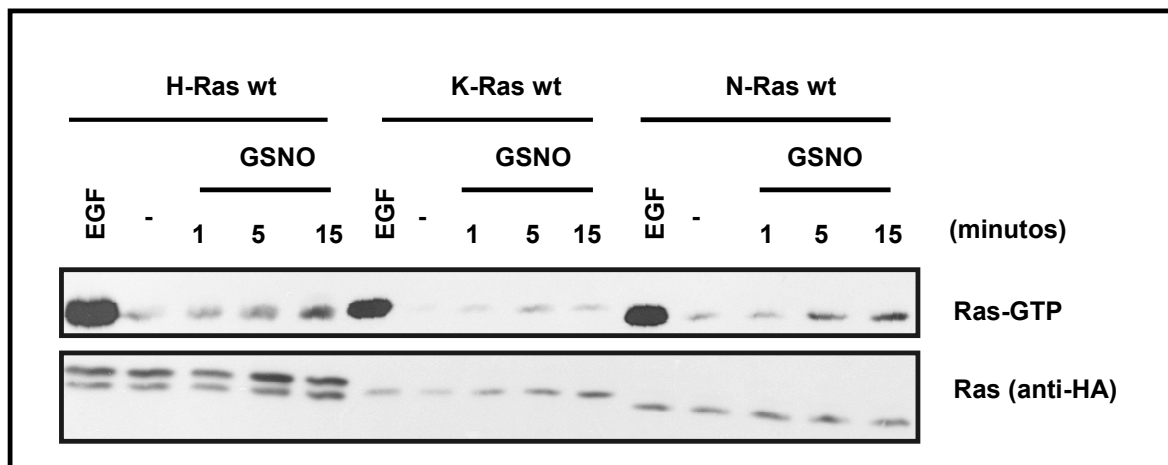


Figura 25. Activación por óxido nítrico de las tres isoformas de Ras. Ensayo de detección de Ras activado en células HeLa transfectadas con pCEFL-H-Ras wt, pCEFL-K-Ras wt, y pCEFL-N-Ras wt y estimuladas *in vivo* con GSNO 500 μ M. Se muestra un experimento de los tres realizados. En todos ellos, la activación de las proteínas Ras se produce de manera similar.

En paralelo comprobamos este resultado en células Jurkat, en las cuales el óxido nítrico se sintetiza por la eNOS tras la estimulación del TCR. Estos experimentos los realizamos en colaboración con el grupo del Dr. Serrador. En ellos encontramos, que K-Ras C118S y N-Ras C118S no se activan por óxido nítrico al carecer de la cisteína 118, tal como ocurre en H-Ras C118S (Ibiza et al., 2008).

Analizamos la activación de las MAPK ERK, p38, y JNK tras la estimulación con NO. El óxido nítrico induce la activación de ERK (Figura 26A), que según lo publicado, es dependiente de Ras (Lander et al., 1996), así como la actividad transcripcional de ELK1 (Figura 26B), uno de los factores de transcripción dependientes de esta vía (Marais et al., 1993). Sin embargo, no hemos detectado activación de p38, ni JNK endógenos (resultados no mostrados), ni tampoco al sobre-expresarlos (Figura 26). Otros autores han descrito, que el óxido nítrico activa las quinasas p38 y JNK (Lander et al., 1996). La discrepancia respecto a nuestros resultados, podría deberse a que emplearon un sistema celular diferente (células

Jurkat, derivadas de linfocitos T) y al método de estimulación empleado (óxido nítrico en forma de gas).

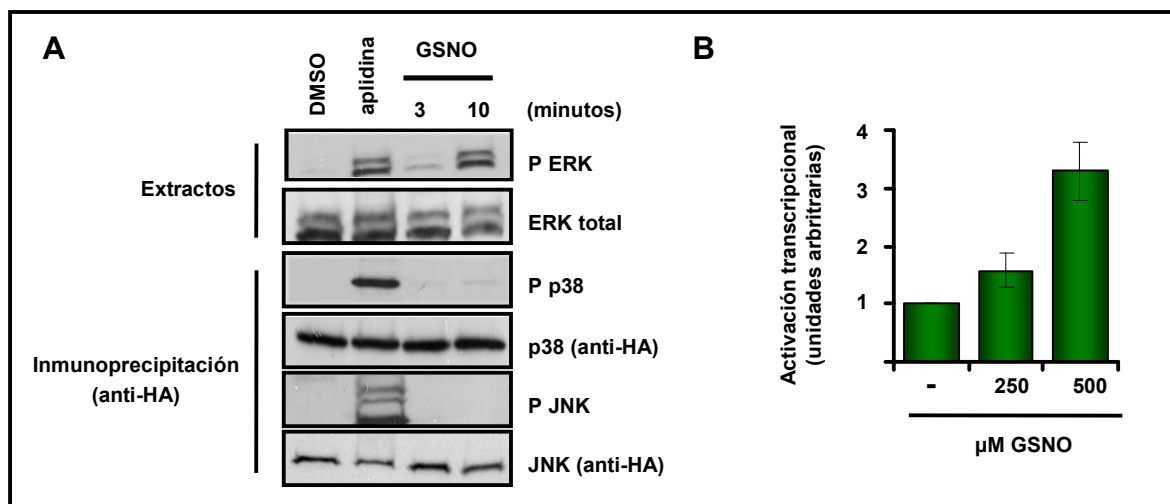


Figura 26. El óxido nítrico activa a ERK y ELK1 pero no activa a p38 ni JNK. A) Se transfectaron células HeLa con pCEFL-HA-JNK o pCEFL-HA-p38. Se estimularon con GSNO y se inmunoprecipitó con anticuerpo anti-HA. El WB del inmunoprecipitado se incubó con los anticuerpos fosfo-específicos y posteriormente se analizaron los niveles totales de inmunoprecipitado mediante incubación con anticuerpo anti-HA. Se muestra la fosforilación y niveles endógenos de ERK como control positivo de la activación por PGA_1 . B) Activación transcripcional de ELK1 medida por ensayos de activación transcripcional. Las células se estimularon durante 1 hora a las concentraciones de GSNO indicadas, y posteriormente se incubaron 4 horas en medio de crecimiento normal.

2.1 Modificación de histonas por óxido nítrico.

Ras hiperactivo disminuye la estabilidad y función transcripcional de las histonas acetil-transferasas (HAT): CBP (CREB-binding protein) y p300 (Sanchez-Molina et al., 2006), enzimas componentes de la maquinaria de transcripción que integran la señalización proveniente de múltiples vías. Nos planteamos si la estimulación de Ras por óxido nítrico, modificaría también a las proteínas HAT. Para ello, comenzamos analizando la modificación de sus sustratos; las histonas. Hemos detectado que tras la estimulación con GSNO, se produce una disminución en la dimetilación de las lisinas 4 y 9 de la histona H3 (modificación relacionada con inactivación transcripcional), y de forma quizás más sutil, una disminución en la trimetilación de la lisina 20 de la histona H4 (Figura 27) (esta última modificación está relacionada con silenciamiento génico en células tumorales y envejecimiento). Otras modificaciones analizadas, tales como la acetilación de la Histona H3 y H4, la trimetilación de la lisina 4 de la histona H3 (modificaciones relacionadas con activación transcripcional), la dimetilación y trimetilación de la lisina 27 de la histona H3 (modificaciones relacionadas con inactivación transcripcional), y la fosforilación de la

serina 10 (relacionada con la entrada en mitosis), no parecen sufrir alteraciones tras el tratamiento con GSNO (datos no mostrados).

Por otro lado, analizamos la actividad transcripcional del coactivador CBP. La estimulación con GSNO, induce un aumento en la activación transcripcional de este factor (Figura 27B).

No hemos detectado diferencias en la estabilidad, ni expresión, de CBP, p300 y pCAF (p300/CBP-Associated Factor) después de la estimulación con GSNO durante 1, 5 y 7 horas (datos no mostrados). Tampoco hemos detectado diferencias en la localización intracelular de ninguna de estas proteínas, encontrándose en el núcleo en todos los casos (datos no mostrados). Asimismo, no hemos detectado modificaciones en la actividad HAT total tras el tratamiento durante 1 hora con GSNO en células NIH3T3 que sobre-expresan H-Ras wt, ni cambios en el patrón de acetilación de histonas, ni por la estimulación con GSNO, ni por la sobre-expresión de Ras hiperactivo (datos no mostrados).

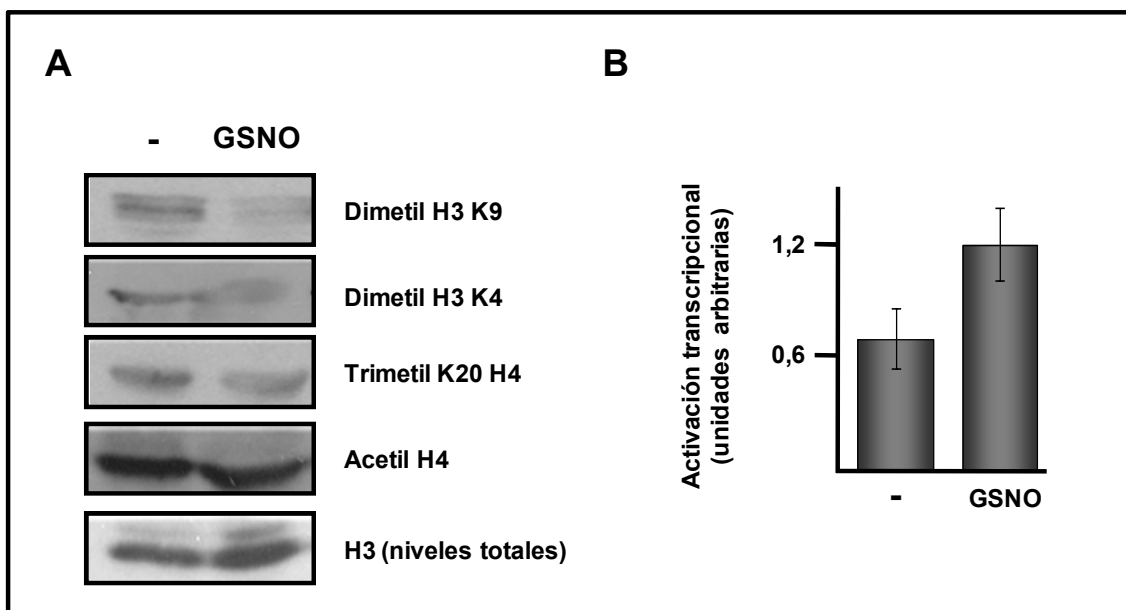


Figura 27. Modificaciones por GSNO en la maquinaria de transcripción. A) WB en el que se muestran las modificaciones globales de histonas de células NIH3T3 tras la estimulación durante 1 hora con GSNO 500 μ M. Resultados similares se han obtenido en tres experimentos independientes. B) Representación del aumento en la activación transcripcional de CBP al estimular durante 1 hora con GSNO a células NIH3T3 que sobre-expresan CBP, en comparación con células NIH3T3 transfectadas con CBP pero estimuladas con DMSO (-). Promedio de tres experimentos realizados independientemente. Las barras del histograma representan la desviación estándar.

La trimetilación y dimetilación de la lisina 9 de la histona H3 ha sido considerada como una "marca epigenética permanente". Sin embargo, recientemente se ha descrito que el oncogen GASC1 y otros miembros de su subfamilia, también producen una disminución en la metilación de esta lisina (Cloos et al., 2006), al igual

que en nuestros resultados. La disminución en la dimetilación de la lisina 4, se asocia con activación transcripcional (Bernstein et al., 2005).

3. LOCALIZACIÓN DE LA ACTIVACIÓN DE RAS POR PGA₁ Y ÓXIDO NÍTRICO

Los resultados mostrados anteriormente indican que la mutación en la cisteína 184 de H-Ras provoca un aumento en la activación de Ras en respuesta a PGA₁ (Figura 17). Según investigaciones previas, H-Ras C184S se localiza en retículo endoplásmico y aparato de Golgi en mayor medida que la versión wt (Rocks et al., 2005; Roy et al., 2005): esto nos llevó a pensar que la activación de las proteínas Ras por PGA₁ podría ocurrir en dichas localizaciones subcelulares. Para abordar esta hipótesis, comenzamos estudiando la localización de las proteínas Ras que sobre-expresamos en los experimentos anteriores.

3.1 Estudio de la localización subcelular de Ras

Determinamos la localización de las proteínas Ras mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal. Las tres isoformas de Ras se localizan en la membrana plasmática y aparato de Golgi (Figura 28). Estos resultados concuerdan con la localización diferencial de las isoformas de Ras descritas por otros autores [revisado en (Omerovic et al., 2007)]. Por otro lado, H-Ras C184S se localiza en retículo endoplásmico en mayor medida que la versión wt (Figura 29), coincidiendo con publicaciones previas (Roy et al., 2005). Sin embargo, H-Ras C118S se distribuye de forma muy similar a H-Ras wt (Figura 29), por lo que la disminución en la activación de este mutante (Figura 17) no es debida a diferencias en su localización.

La distribución subcelular de las isoformas y mutantes de las proteínas Ras apoya nuestra hipótesis según la cual Ras podría activarse en endomembranas en respuesta a PGA₁. Así, H-Ras C184S, el mutante que se activa de forma más potente por PGA₁ que H-Ras wt (Figura 17), se localiza en endomembranas en mayor proporción que la versión normal. Para confirmar nuestra hipótesis, continuamos nuestro estudio empleando versiones de H-Ras dirigidas a regiones subcelulares específicas y analizamos su activación por PGA₁.

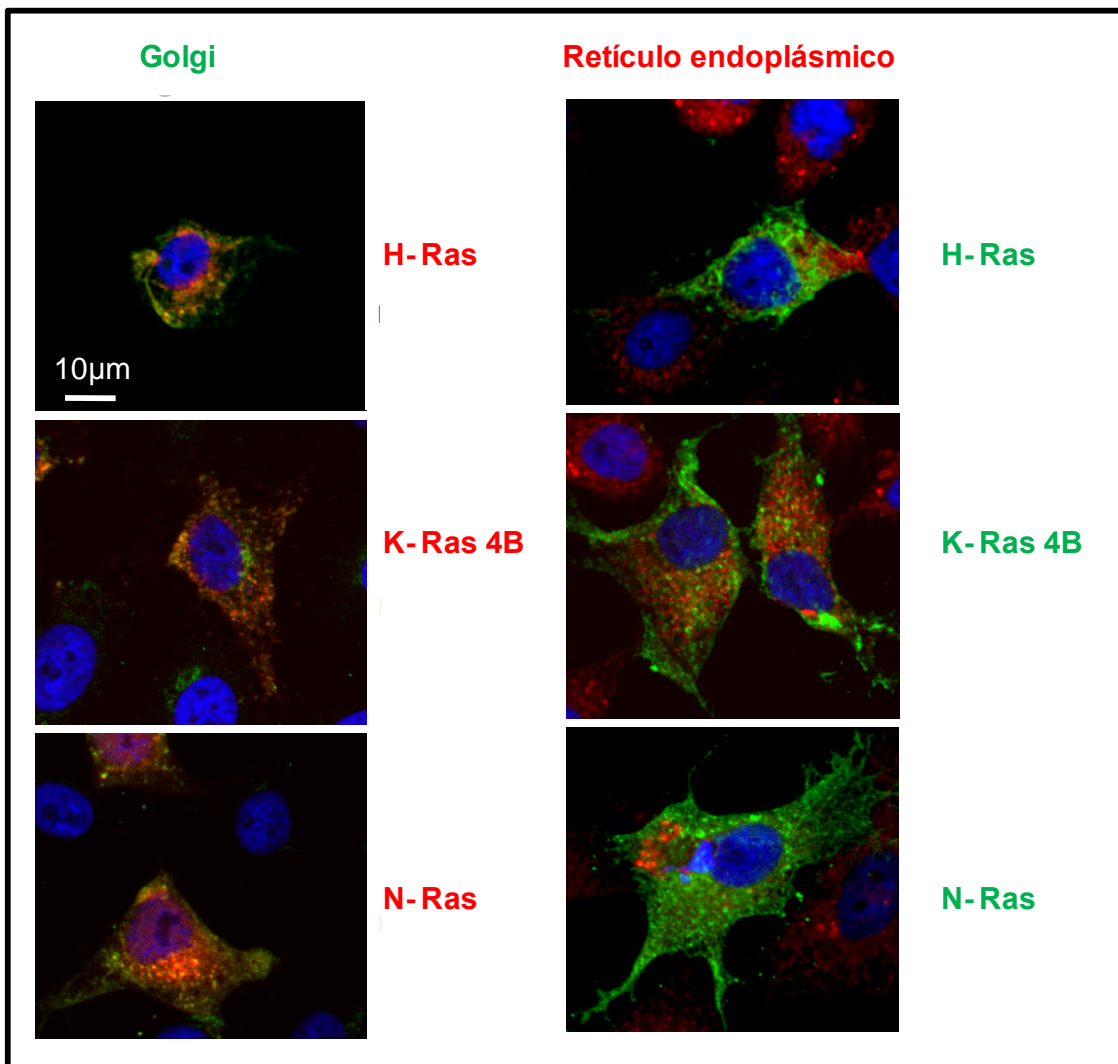


Figura 28. Localización de las isoformas de Ras. Imágenes de microscopía confocal de células HeLa transfectadas transitoriamente con las isoformas de Ras. A) Ras (rojo) y aparato de Golgi (anti-Golgin, verde). B) Ras (verde) y retículo endoplásmico (anti-PDI, rojo). Resultados similares se obtuvieron en tres experimentos independientes.



Figura 29. Localización de H-Ras C118S y H-Ras C184S. Células Hela transfectadas transitoriamente. Imágenes de microscopía confocal. Ras (verde) y retículo endoplásmico (anti-PDI, rojo). Resultados similares se obtuvieron en tres experimentos independientes.

3.2 Localización subcelular de la activación de Ras en respuesta a PGA_1 y NO.

Analizamos la activación por PGA_1 en proteínas H-Ras ancladas específicamente en retículo endoplásmico (M1-H-RasSS), aparato de Golgi (KDEL-H-RasSS), membrana desordenada (CD8-H-RasSS) y balsas lipídicas (LCK-H-RasSS), cuyos plásmidos respectivos fueron cedidos amablemente por el Dr. Piero Crespo (CSIC, Universidad de Cantabria). Tras el tratamiento con PGA_1 se produjo estimulación de H-Ras localizado en retículo endoplásmico, y de forma más débil, en H-Ras anclado en aparato de Golgi (Figura 30A y 30B). A diferencia de los resultados obtenidos por otros autores (Chiu et al., 2002), no se produjo activación de Ras anclado a retículo endoplásmico tras la estimulación con EGF a 15, 20 ni 30 minutos (Figura 30A y resultados no mostrados). Por otro lado, no se detectó activación de H-Ras por PGA_1 , ni en balsas lipídicas, ni en membrana desordenada (Figura 30A).

Estos resultados, sumados a los obtenidos con el mutante Ras C184S (Figuras 17 y 29), apoyan que la activación de Ras por PGA_1 ocurre fundamentalmente en retículo endoplásmico, y en menor proporción en aparato de Golgi.

Para comprobar la estimulación de Ras por PGA_1 en regiones de endomembranas, empleamos la línea celular CH7C17 derivada de linfocitos T (Ibiza et al., 2006; Perez de Castro et al., 2004), y detectamos el cambio de localización de Raf-RBD (dominio del efector Raf) (Figura 31). Los cambios en la localización de Raf1-RBD son indicativos de la activación de Ras, ya que este dominio de Raf se une únicamente a Ras cuando éste se ha activado. Así, en ausencia de estímulo, Raf1-RBD está disperso en el citoplasma celular (Figura 31C). Después de la estimulación del receptor de células T, Raf1-RBD se localiza en membrana plasmática y aparato de Golgi (Figura 31B y C). Sin embargo, la estimulación con PGA_1 induce relocalización únicamente en endomembranas (Figura 31B y C), indicando que Ras se activa en estas regiones en respuesta a PGA_1 y confirmando nuestros resultados previos.

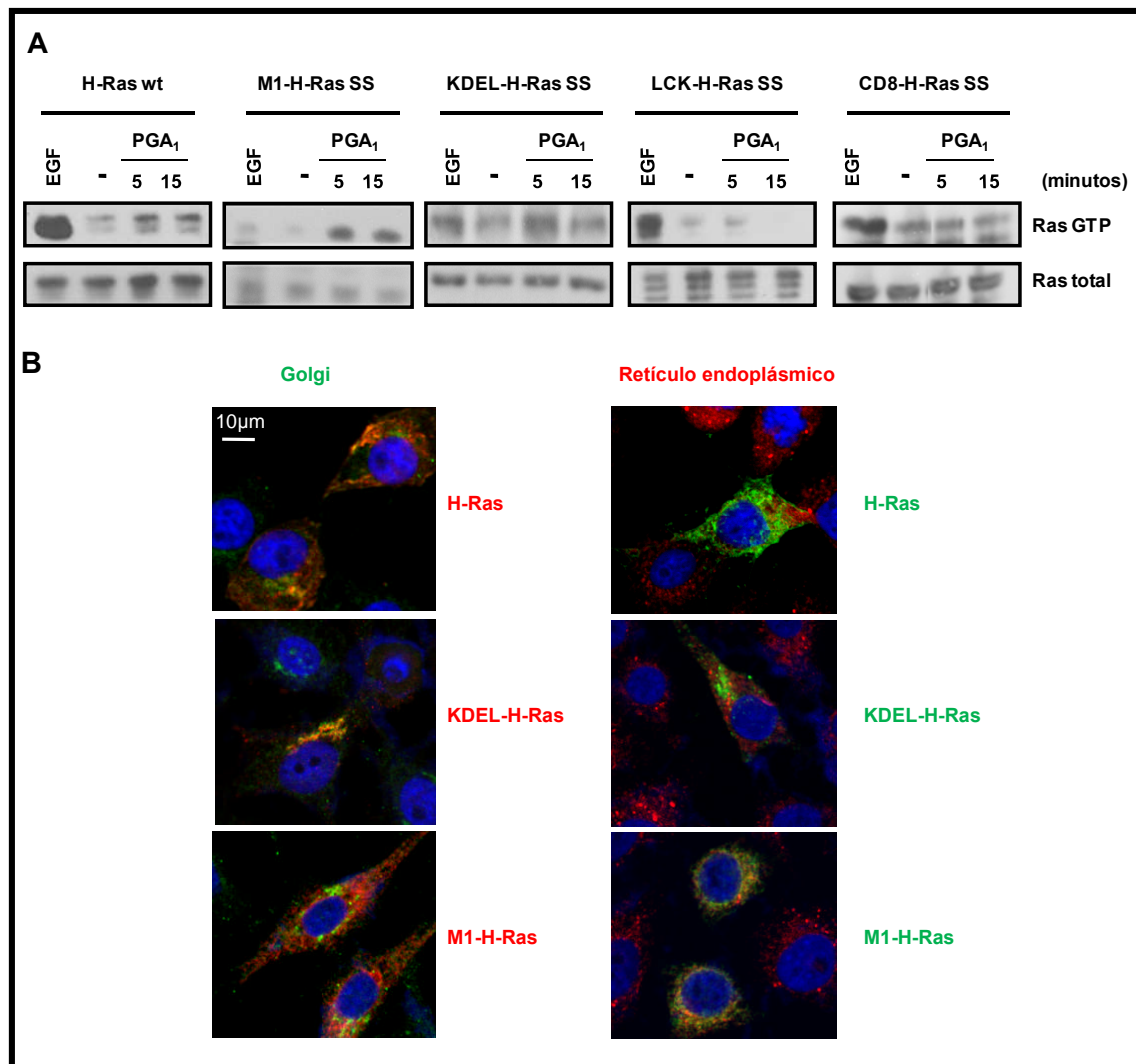


Figura 30. Activación de Ras dirigido a diferentes compartimentos intracelulares por PGA₁. Células HeLa transfectadas transitoriamente con diferentes construcciones de H-Ras. A) Ensayo de detección de Ras-GTP. EGF: células estimuladas 15 minutos. Resultados similares fueron obtenidos en tres experimentos independientes. B) Imágenes de microscopía confocal en las que se muestra la localización de las proteínas Ras, ancladas a las regiones subcelulares en las que se detectó activación por PGA₁. Columna izquierda: Ras (rojo), aparato de Golgi (anti-Golgin, verde). Columna derecha: Ras (verde) y retículo endoplásmico (anti-PDI, rojo).

Por otro lado, el donante de óxido nítrico, DEA-NO, induce la relocalización de Raf-RBD en membrana plasmática y endomembranas (Figura 31B y C) de acuerdo a lo anteriormente descrito (Ibiza et al., 2008).

3.3 Rutas de señalización y localización de Ras.

Ras estimula a diferentes vías efectoras, dependiendo de dónde se produzca su activación (Chiu et al., 2002; Matallanas et al., 2006). Para estudiar qué efectores se estimulan por la activación de Ras en las localizaciones en las que se induce su

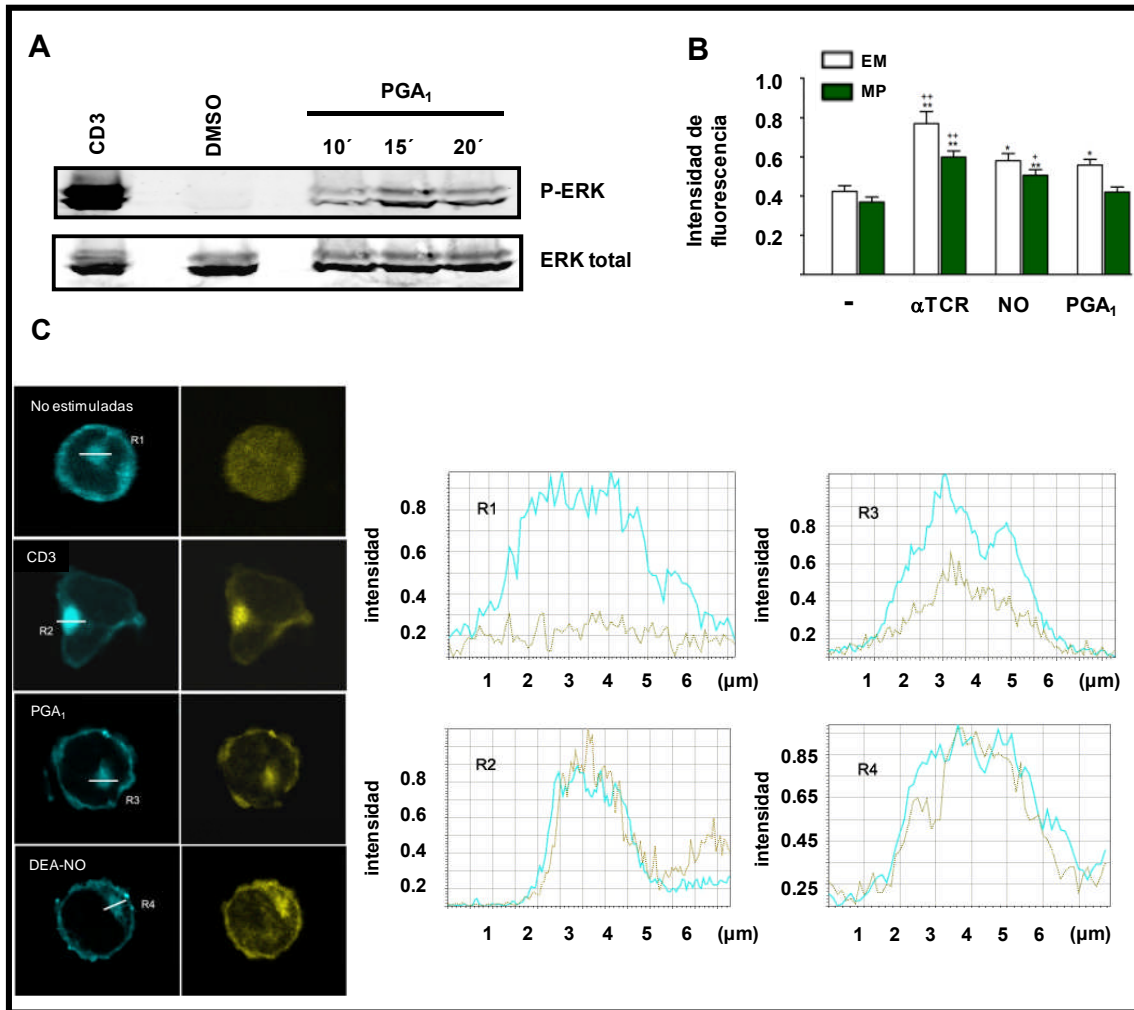


Figura 31. Activación de Ras *in vivo* por PGA₁ y NO en células CH7C17. A) Activación de ERK en células CH7C17 tras la estimulación con PGA₁ y anti-CD3. B) Histograma representativo de la cuantificación del cambio de localización de Raf1-RBD en respuesta a PGA₁. Se representa el promedio \pm la desviación estándar de 100 células. El análisis estadístico se ha realizado respecto a las células no estimuladas. *: $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.001$. EM: endomembranas; principalmente aparato de Golgi (Ibiza et al., 2006; Perez de Castro et al., 2004). MP: membrana plasmática. C) Panel izquierdo: Imágenes de microscopía confocal en las que se muestra el cambio en la localización de Raf1-RBD-YFP en respuesta a PGA₁ y DEA-NO en células CH7C17. Paneles derechos: Cuantificación de la intensidad de señal emitida por H-Ras-CFP (azul) y Raf1-RBD-YFP (amarillo) en las regiones indicadas en las inmunofluorescencias, las cuales se corresponden a regiones de endomembranas, principalmente del aparato de Golgi.

mayor activación por PGA₁, sobre-expresamos Ras dirigido al retículo endoplásmico y aparato de Golgi, y analizamos la activación de ERK, AKT, JNK, y ERK5 por WB. La sobre-expresión de Ras en retículo endoplásmico y aparato de Golgi incrementa la activación de ERK en respuesta a PGA₁ respecto a la sobre-expresión de H-Ras wt (Figura 32). No se detectó estimulación de otras rutas de señalización dependientes de Ras como JNK, ERK5, ni AKT (datos no mostrados).

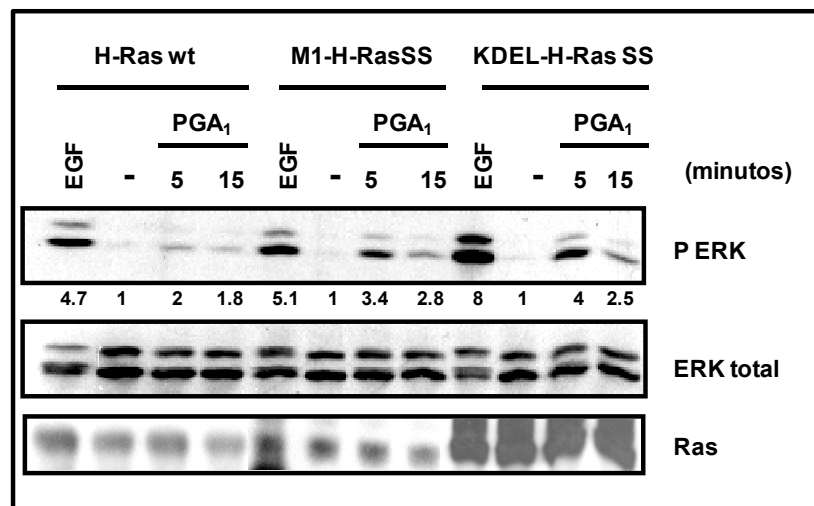


Figura 32. Activación de ERK por Ras en distintas localizaciones subcelulares. WB de células Hela transfectadas transitoriamente con pCEFL-HA-H-Ras wt, y Ras localizado en retículo endoplásmico (pCEFL-HA-M1-H-RasSS) y aparato de Golgi (pCEFL-HA-KDEL-H-Ras). Se muestra la cuantificación de ERK fosforilado en la parte inferior del WB. La desviación estándar fue inferior al 10% de la media. Resultados similares se obtuvieron en tres ensayos independientes.

Nuestros resultados indican que PGA₁ activa a H-Ras localizado en retículo endoplásmico y aparato de Golgi, produciendo la estimulación de la vía de señalización Raf-MEK-ERK. Estos resultados concuerdan parcialmente con los publicados por otros autores; se ha descrito que Ras anclado en retículo endoplásmico induce la activación de ERK, PI3K y JNK, y el anclado en el aparato de Golgi la estimulación de RalGDS (Matallanas et al., 2006); mientras otro grupo detectó que Ras anclado en retículo endoplásmico activa a JNK, y en el aparato de Golgi a ERK y AKT (Chiu et al., 2002). Las diferencias respecto a nuestros resultados podrían deberse a que en los trabajos de estos autores se han empleado proteínas Ras que están constitutivamente activas, mientras que PGA₁ produce una activación transitoria de Ras. La actividad sostenida de Ras crea un contexto bioquímico diferente al de células normales, debido, entre otros factores, a la inducción de genes (Michael D. Oberst, 2005) y a la producción de ROS (Chuang et al., 2003), los cuales podrían ocasionar diferencias en la unión, disponibilidad, o existencia de efectores. Quizás estas diferencias en el contexto bioquímico sean también la explicación de parte de la discrepancia entre los trabajos de los autores mencionados, ya que han utilizado diferentes líneas celulares en sus trabajos; células NIH3T3 (fibroblastos de ratón) y cos1 (fibroblastos de mono). A su vez, PGA₁ podría influir en la interacción de Ras con sus efectores por mecanismos independientes de Ras.

4. Efectos celulares de PGA₁

Nuestros resultados demuestran que PGA₁ induce la activación de la vía Ras-Raf-MEK-ERK. Esta vía de señalización da lugar a distintos efectos biológicos dependiendo del contexto celular; así, esta vía puede inducir proliferación, diferenciación o apoptosis (Crespo and Leon, 2000).

4.1 PGA₁ favorece la diferenciación de células PC12.

Dado que la vía Raf-MEK-ERK es esencial para que se produzca la diferenciación de células PC12 (Vaudry et al., 2002), analizamos si PGA₁ tiene algún efecto sobre la diferenciación celular empleando este modelo. NGF induce la formación de neuritas en estas células, lo cual es indicativo de diferenciación (Figura 33A). El co-tratamiento con NGF y PGA₁ induce un incremento en el número de células diferenciadas respecto al tratamiento sólo con NGF, tal como muestran nuestros resultados en la Figura 33B; además, el co-tratamiento con PGA₁ induce un aumento en la longitud de las neuritas, observándose células con neuritas que miden más de tres veces la longitud de su soma (Figura 33B). Sin embargo, el tratamiento sólo con PGA₁ da lugar a muerte celular (Figura 33A).

4.1.1. Ras e inducción de diferenciación por PGA₁.

Para comprobar que la activación de Ras es la que induce el incremento de diferenciación por el co-tratamiento con PGA₁, transfectamos células PC12 con H-Ras wt y el mutante de Ras no activable por PGA₁, H-Ras C118S. La sobre-expresión de H-Ras wt produce un incremento del porcentaje de células diferenciadas al tratar con NGF y con NGF más PGA₁ (Figura 33C). La sobre-expresión de H-Ras C118S y tratamiento con NGF da lugar a un aumento del porcentaje de diferenciación similar al producido por la sobre-expresión de H-Ras wt, lo cual indica que este mutante no tiene alterada su capacidad de inducir diferenciación. Sin embargo, a diferencia del aumento ocurrido con H-Ras wt, la sobre-expresión de H-Ras C118S no produce un aumento significativo en la diferenciación al co-tratar con NGF y PGA₁ (Figura 33C). Además, este mutante, no induce un aumento en el número de células con neuritas que midan más de 3 veces la longitud de su soma tras la estimulación con NGF y PGA₁ (Figura 33D). Nuestros resultados indican que PGA₁ incrementa la diferenciación por NGF en

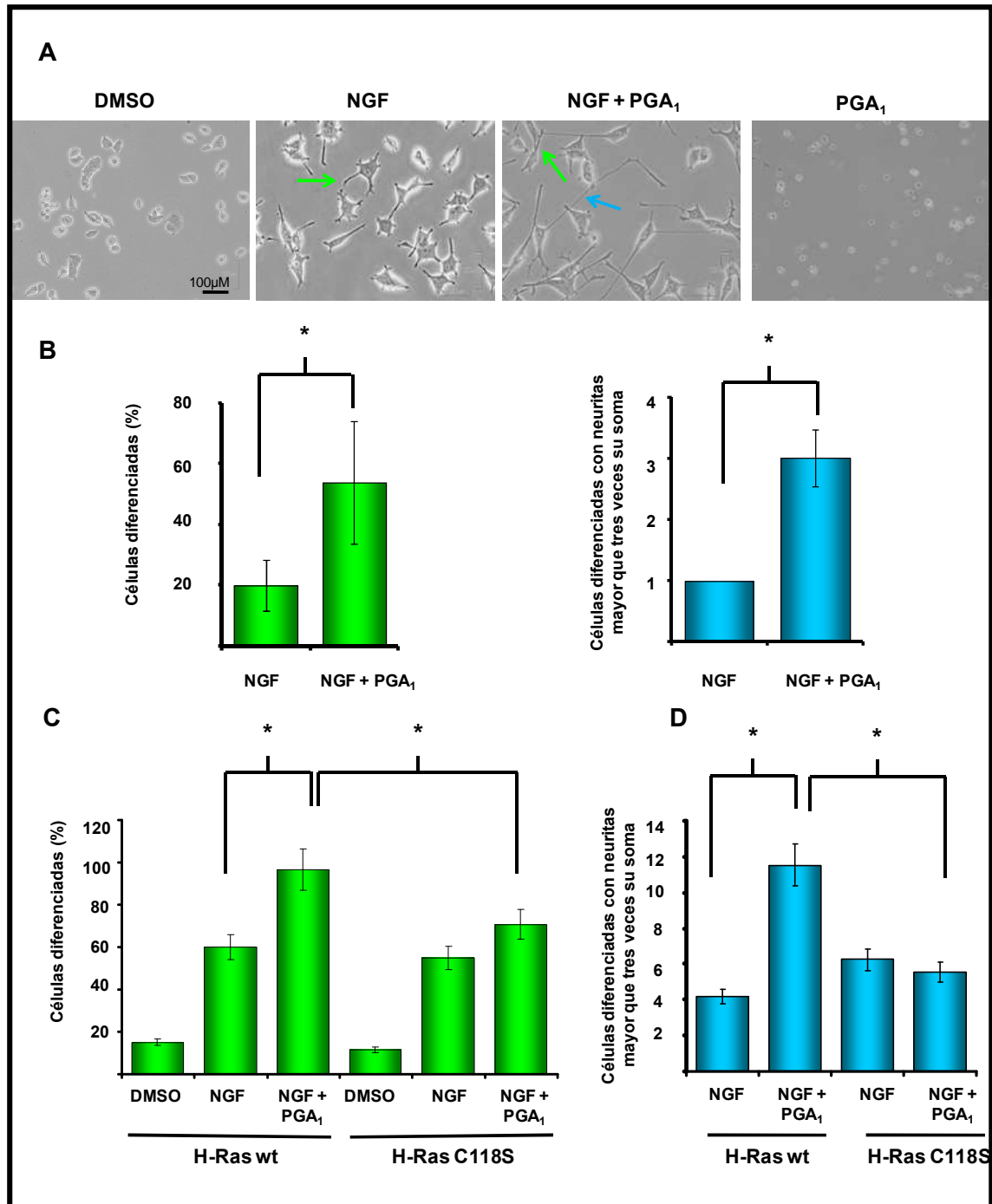


Figura 33. PGA₁ produce un aumento en la diferenciación de células PC12. Células tratadas 48h. A) Fotos de cultivo. Flechas verdes: neuritas. Flecha azul: neurita de longitud mayor que tres veces el soma de la célula. B) Panel izquierdo: porcentaje de células diferenciadas al co-tratar con PGA₁. Panel derecho: incremento del número de células cuyas neuritas son mayores que tres veces el tamaño de su soma. C) Células transfectadas con H-Ras wt vs H-Ras C118S: porcentaje de células diferenciadas. D) Incremento del número de células cuyas neuritas son mayores que tres veces el tamaño de su soma en células que sobre-expresan H-Ras wt frente a células que sobre-expresan H-Ras C118S. Resultados obtenidos en tres experimentos independientes. *:p<0.01. Las barras de los histogramas representan la desviación estándar.

células PC12 a través de H-Ras

Se había descrito que PGA_1 induce un aumento en la diferenciación de células de eritroleucemia de Friend (Santoro et al., 1979), pero no se han determinado los mecanismos moleculares implicados en ello. En este sistema celular, PGA_1 induce parada de ciclo celular e inducción de diferenciación, por sí misma, a diferencia de lo que ocurre en nuestros experimentos, en los cuales el tratamiento con PGA_1 induce muerte en las células PC12 (Figura 33A). La inducción de muerte celular por PGA_1 en las células PC12 podría deberse a que PGA_1 se une e inhibe la funcionalidad de tioredoxina (Tonge et al., 2008), la cual está implicada en la protección a daño por peróxidos de hidrógeno (Yun-Song et al., 2003). La investigación de Tonge et al, sugiere que la unión de PGA_1 a tioredoxina inhibe la regeneración axonal en nervios periféricos lesionados, al impedir el transporte retrógrado de proteínas mediado por tioredoxina. Este tipo de transporte es necesario para el proceso de diferenciación neuronal (Tonge et al., 2008). Es posible que tanto el efecto de inducción de muerte celular como el de inhibición de regeneración (y previsiblemente de diferenciación) descritos por estos autores, estén disminuidos en nuestros experimentos (en los cuales co-tratamos con PGA_1 y NGF) debido a que el NGF induce la síntesis de tioredoxina (Bai et al., 2003). Nuestros datos, junto con las investigaciones mencionadas, sugieren que el tratamiento sólo con PGA_1 podría inducir muerte en la línea PC12 al producir daño oxidativo que no podría ser evitado por la tioredoxina. El cotratamiento con NGF y PGA_1 induciría un aumento de la diferenciación mediada por NGF, ya que no se produciría muerte celular al compensar el NGF la inhibición de tioredoxina ocasionada por PGA_1 (que protegería del daño oxidativo inducido por la activación de H-Ras por PGA_1 ; ver discusión del apartado “ PGA_1 induce apoptosis”) y PGA_1 estimularía adicionalmente a las proteínas Ras, lo cual ocasionaría el incremento en el porcentaje de diferenciación observado en nuestros experimentos (Figura 33C).

Se han generado compuestos derivados de PGA_1 que inducen el crecimiento de neuritas en células PC12 y neuronas del sistema nervioso central, denominados NEPP's (o prostaglandinas promotoras del crecimiento de neuritas) (Satoh et al., 2000b). Estos compuestos promueven la diferenciación solamente en presencia de NGF (al igual que ocurre en nuestros experimentos con PGA_1), pero independientemente de la activación de ERK (Satoh et al., 2000a). A diferencia de nuestros resultados, estos autores no han encontrado un aumento en la diferenciación tras el tratamiento con PGA_1 no modificada. Los NEPP's poseen dos dobles enlaces conjugados (conjugados di-enona) a diferencia de PGA_1 , que posee solamente uno

(conjugado mono-enona). Este segundo doble enlace podría disminuir la tendencia a formar aductos tioles y con ello sería exportado en menor medida al exterior celular. Los NEPP's forman enlaces covalentes con grupos tioles de proteínas en el retículo endoplásmico con lo que interfieren en el proceso de plegamiento proteico. Así estos autores han encontrado un aumento en la inducción de BiP/GRP78 (chaperona implicada en el plegamiento proteico en el retículo endoplásmico), la cual está implicada en la respuesta de estrés del retículo endoplásmico. Es posible que estos autores no hayan encontrado diferenciación por PGA_1 , debido a que en sus condiciones experimentales PGA_1 no permanezca el tiempo suficiente en el interior neuronal (al ser exportado en forma de aductos tiol mediante la bomba exportadora de glutathione dependiente de ATP), lo cual podría deberse en parte, a variaciones en las condiciones de oxidación-reducción entre ambos experimentos. Por otro lado, nuestros resultados indican que es necesaria la activación de Ras para la inducción de diferenciación por PGA_1 , lo cual produce la activación de ERK en las células PC12 (Vaudry et al., 2002).

Nuestros resultados indican que Ras se activa en respuesta a PGA_1 principalmente en retículo endoplásmico y aparato de Golgi (Figuras 30 y 31). Pensamos que el aumento de diferenciación ocasionado por PGA_1 (Figura 33), podría ser debido a la activación de Ras en endomembranas, dado que un incremento en la actividad de Ras en el aparato de Golgi induce diferenciación en células PC12 (Bivona et al., 2003).

4.2 PGA₁ induce apoptosis

La vía Raf-MEK-ERK es esencial en los procesos de proliferación celular, y desde hace un tiempo se ha descubierto su papel en apoptosis (Cox and Der, 2003). Dado que PGA₁ induce la activación de esta vía, estudiamos si la estimulación de Ras-Raf-MEK-ERK por PGA₁ está implicada en proliferación o muerte celular. Para ello realizamos contajes del número de células vivas 24, 48 y 72h después de la estimulación con PGA₁. El tratamiento con PGA₁ en células NIH3T3, produce una disminución en el número de células vivas tras 24h de estimulación, incluso en presencia de FGF (Figura 34).

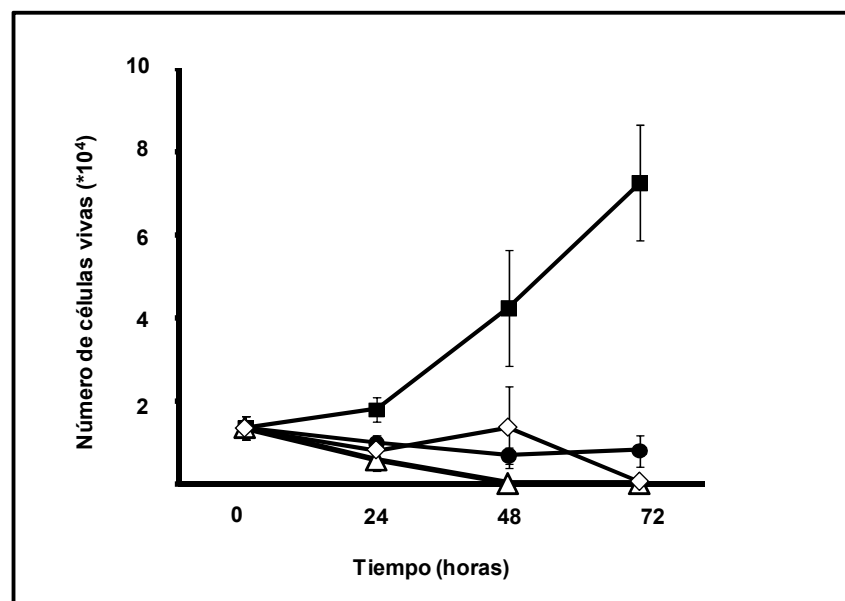


Figura 34. Efectos celulares de la estimulación con PGA₁ en NIH3T3. Representación del número de células vivas (promedio \pm desviación estándar) de células estimuladas con 50 µg/mL FGF (■), PGA₁ 10 µM (Δ), 50 µg/mL FGF y PGA₁ 10 µM (◊) y DMSO (●). La disminución de células vivas tras la estimulación con PGA₁ es estadísticamente significativa a las 24, 48 y 72h, $p < 0.05$ (U Mann-Whitney). Promedio de tres experimentos independientes, con duplicados.

Para determinar el tipo de muerte celular comenzamos analizando, mediante citometría de flujo, la externalización de fosfatidil-serina; evento característico de las fases iniciales de la apoptosis cuando se produce sin que exista ruptura de la membrana celular (identificada por la tinción con ioduro de propidio, IP) (Vermes et al., 1995). La externalización de la fosfatidil-serina la detectamos por su unión a anexina V. La población apoptótica se caracteriza por ser anexina V positiva e IP negativa en las fases iniciales, por lo que también se denomina población apoptótica temprana. En etapas más avanzadas de la apoptosis, la membrana celular pierde su integridad, por lo que el IP puede penetrar en su interior, al igual que en las células necróticas

(anexina V e IP doble positivas); esta población está formada tanto por células apoptóticas tardías, como por células necróticas. Para analizar la apoptosis temprana por PGA₁ mediante citometría de flujo, estimulamos células NIH3T3 durante cinco horas con PGA₁ 10 μ M. El porcentaje de apoptosis temprana (células anexina V positivas, IP negativas) aumenta 2 veces respecto a las células control, y 3 veces después del tratamiento con 30 μ M de PGA₁ (Figura 35A y B).

Otra de las características de las células apoptóticas es la aparición de una población subG0/G1. Tras 9 horas de tratamiento con PGA₁ encontramos que aproximadamente el 30% de las células NIH3T3 se corresponde con esta población (Figura 35C). Para determinar si se produce condensación de la cromatina (otro de los eventos indicativos de apoptosis), teñimos los núcleos con DAPI y después de 24 horas, observamos que un 75% de los núcleos de las células NIH3T3 tratadas con PGA₁ 30 μ M presentan esta característica (Figura 35D).

La ejecución de la muerte celular en la apoptosis, está mediada generalmente por la activación de caspasas. Como muestra la Figura 35E, después de 3 horas de tratamiento con PGA₁ se produce proteólisis y consecuentemente la activación de la caspasa efectora 3, así como la proteólisis de su sustrato PARP. Estos eventos demuestran que el mecanismo de muerte celular inducido por PGA₁ es apoptosis. Para determinar mediante qué vía efectora se ejecuta, analizamos la activación de las caspasas 8, 9 y 12. PGA₁ produce activación de las caspasas 9 y 12 (Figura 35E), sugiriendo que la apoptosis comienza en retículo endoplásmico y mitocondria. Descartamos la iniciación vía receptor, dado que no detectamos una activación significativa de caspasa 8 (Figura 35E).

Comprobamos que la activación de caspasas es necesaria para la apoptosis inducida por PGA₁, tratando células NIH3T3 con un inhibidor de caspasas, previamente a la estimulación con PGA₁. En presencia del inhibidor de caspasas, PGA₁ no induce apoptosis, lo cual indica que la inducción de apoptosis por PGA₁ es dependiente de la activación de caspasas (Figura 36).

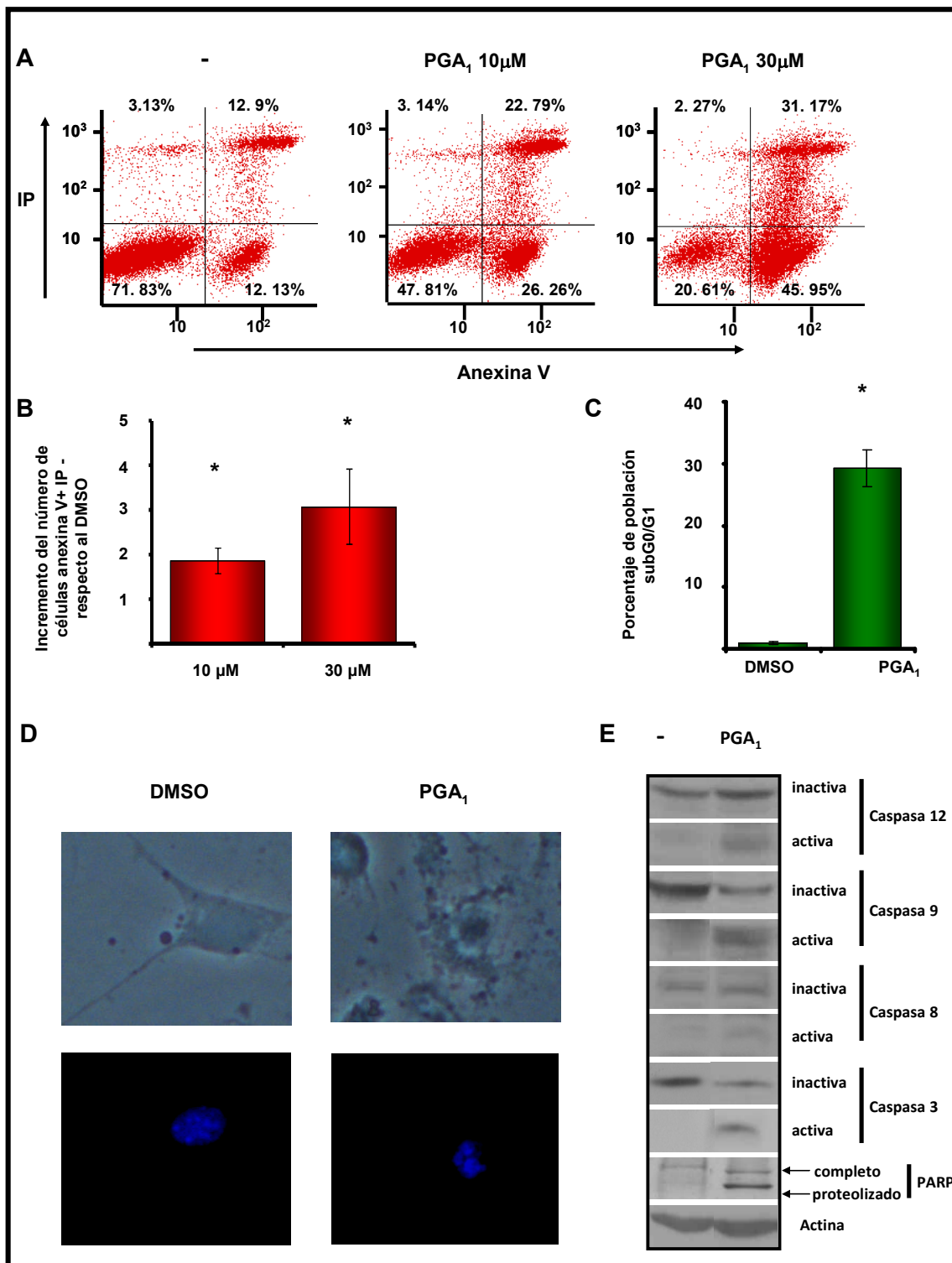


Figura 35. PGA₁ induce apoptosis en la línea celular NIH3T3. A) Citometría de flujo de marcaje con IP y anexina V. La población apoptótica temprana se corresponde con el cuadrante inferior derecho de cada gráfico. B) Representación del aumento de apoptosis al tratar con PGA₁. Promedio de 4 experimentos independientes. Las barras representan la desviación estándar. *: diferencias estadísticamente significativas respecto al tratamiento con DMSO, $p < 0.01$ (U Mann-Whitney). C) Representación de la población subG0/G1 después de 9 horas de estimulación con PGA₁. Marcaje con IP, determinación mediante citometría de flujo. Promedio de tres experimentos independientes (Barras: desviación estándar). *: $p < 0.05$, (U Mann-Whitney) D) Aspecto celular en campo claro (paneles superiores), y tinción de núcleos con DAPI (paneles inferiores). E) WB de caspasas de células tratadas durante 3h con PGA₁. Los experimentos mostrados en D y E son representativos de tres ensayos.

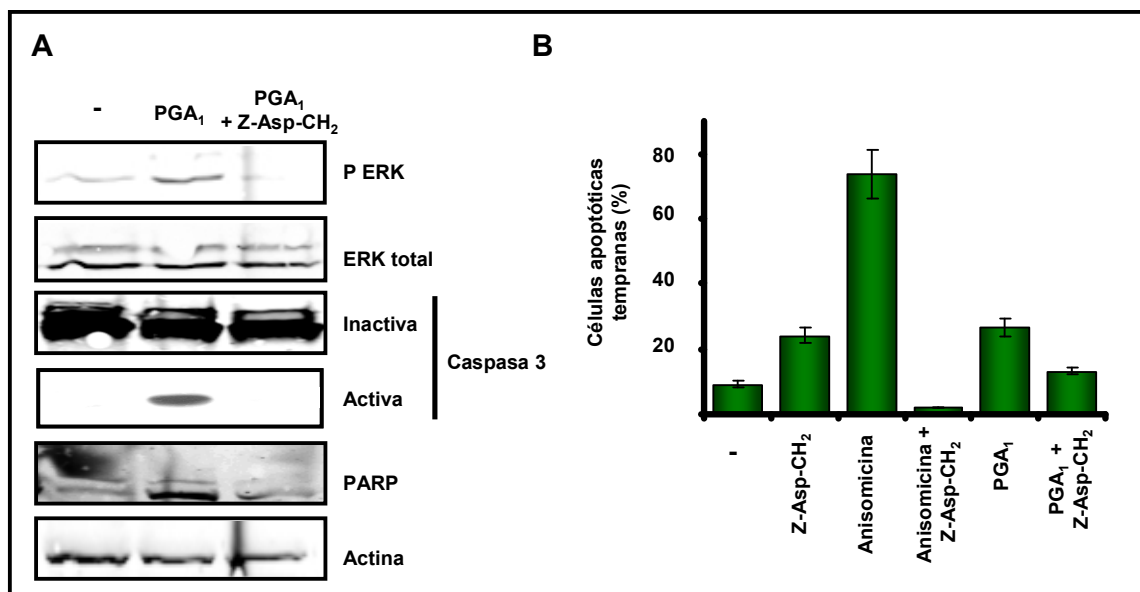


Figura 36. La inhibición de la activación de caspasas impide la inducción de apoptosis por PGA₁. Células NIH3T3 se trataron con \pm el inhibidor de pan-caspasas Z-Asp-CH₂ a una concentración de 1 μ M durante 30 minutos. A) Posteriormente se estimuló con PGA₁ 30 μ M \pm el inhibidor durante 15 minutos para analizar activación de ERK, y durante 3 horas para analizar la activación de caspasas. Este ensayo es representativo de tres experimentos independientes. B) Después del tratamiento con \pm el inhibidor, se estimuló con PGA₁ 30 μ M \pm el inhibidor o anisomicina \pm el inhibidor durante 5 horas para analizar la población apoptótica temprana mediante citometría de flujo. Promedio de tres experimentos independientes. Barra de error: desviación estándar.

4.2.1. Ras e inducción de apoptosis por PGA₁.

Nuestros resultados indican que PGA₁ induce apoptosis en células NIH3T3. Para determinar si las proteínas Ras son relevantes en la apoptosis inducida por PGA₁, tratamos MEFs wt, H-Ras $-/-$, N-Ras $-/-$, y H- y N-Ras dKO con PGA₁. En los MEFs wt y en los que no expresan H- o N-Ras, se produce la activación de las caspasas 12, 9 y 3 y la proteólisis de su sustrato, PARP (Figura 37A), todo ello indicativo de apoptosis. Sin embargo, esto no se produce en los MEFs Ras dKO (Figura 37A), los cuales no expresan H-Ras, ni N-Ras (Figura 37C). Analizando la población apoptótica temprana mediante citometría de flujo (anexina V +, IP-), comprobamos que los MEFs wt, H-Ras $-/-$ y N-Ras $-/-$ sufren apoptosis después del tratamiento con PGA₁ (Figura 37B) y tienen un comportamiento similar, sin diferencias estadísticamente significativas en la inducción de apoptosis por PGA₁ entre ellos (U Mann-Whitney, $p < 0.05$). Sin embargo, no hay apoptosis en los MEFs dKO por PGA₁ (Figura 37B).

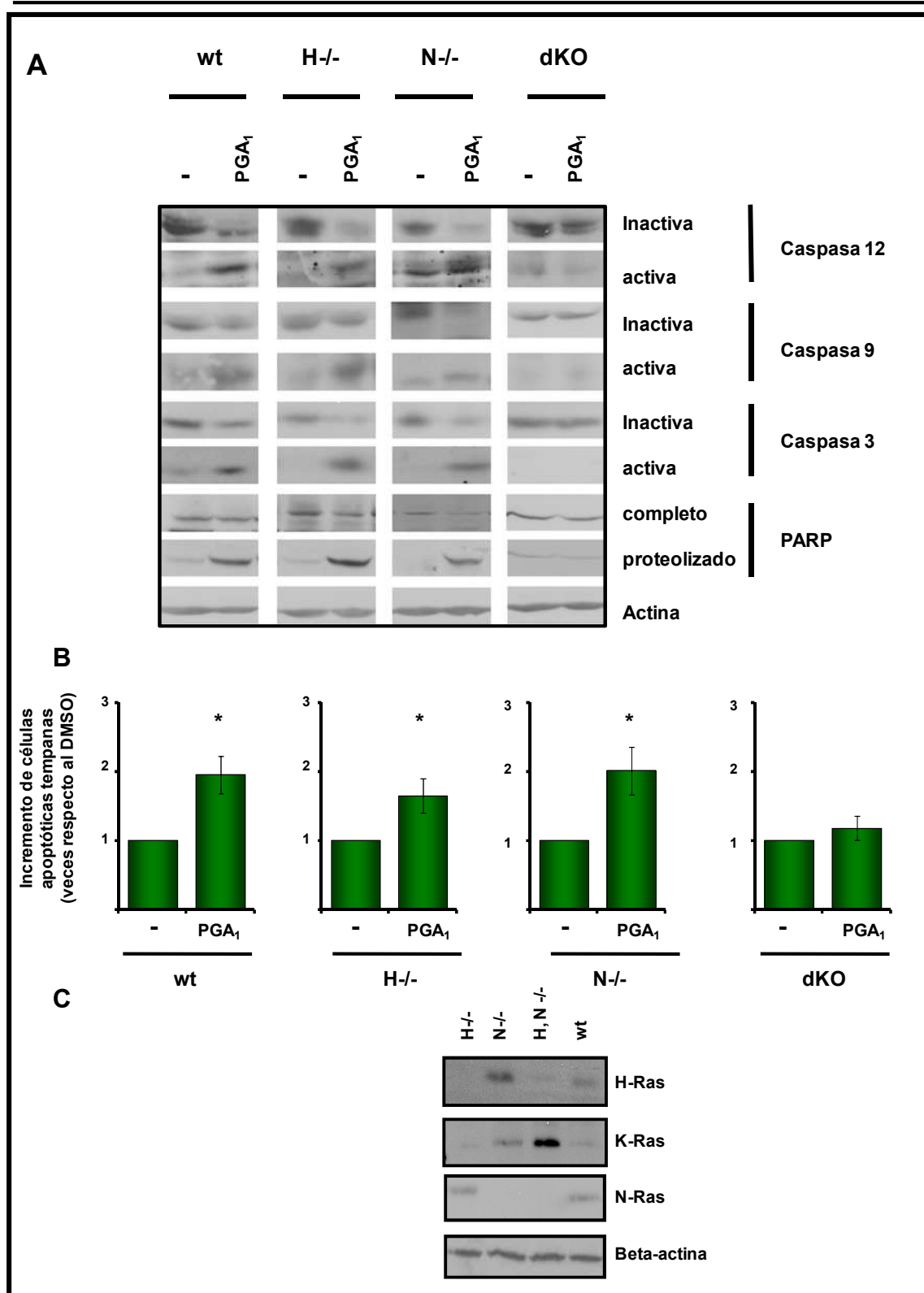


Figura 37. Apoptosis por PGA₁ en MEFs KOs de Ras. A) WB en el que se muestran las caspasas 12, 9 y 3 no proteolizadas (inactivas) y proteolizadas (activas), así como la proteólisis de su sustrato PARP, tras 3 horas de estimulación con PGA₁ 30 μ M. Resultados similares se obtuvieron en 4 experimentos independientes B) Representación del incremento de la población apoptótica temprana tras la estimulación con PGA₁ respecto a células tratadas con DMSO. Promedio de 5 experimentos (Las barras representan la desviación estándar). Esta población fue caracterizada mediante citometría de flujo, tras 5 horas de estimulación con PGA₁ 30 μ M. *: $p < 0.05$ (U Mann-Whitney). C) WB en el que se muestran los niveles de expresión de las isoformas de Ras en los MEFs. El experimento mostrado es representativo de 3 ensayos.

Posteriormente determinamos la implicación de las distintas isoformas de Ras en la activación de ERK inducida por PGA_1 . Para ello estimulamos MEFs wt, H-Ras $-/-$, N-Ras $-/-$ y H- y N- Ras $-/-$, y analizamos la activación de ERK por WB (Figura 38). Se produce activación de ERK en todos los tipos de MEFs, siendo más intensa la activación en los MEFs dKO, los cuales no poseen H- ni N- Ras, pero expresan mayor cantidad de K-Ras (Figura 37C).

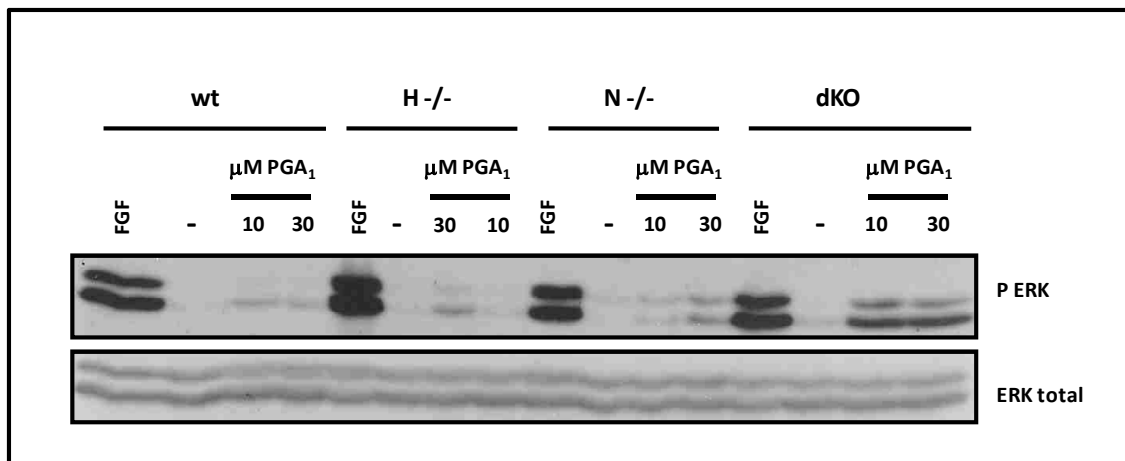
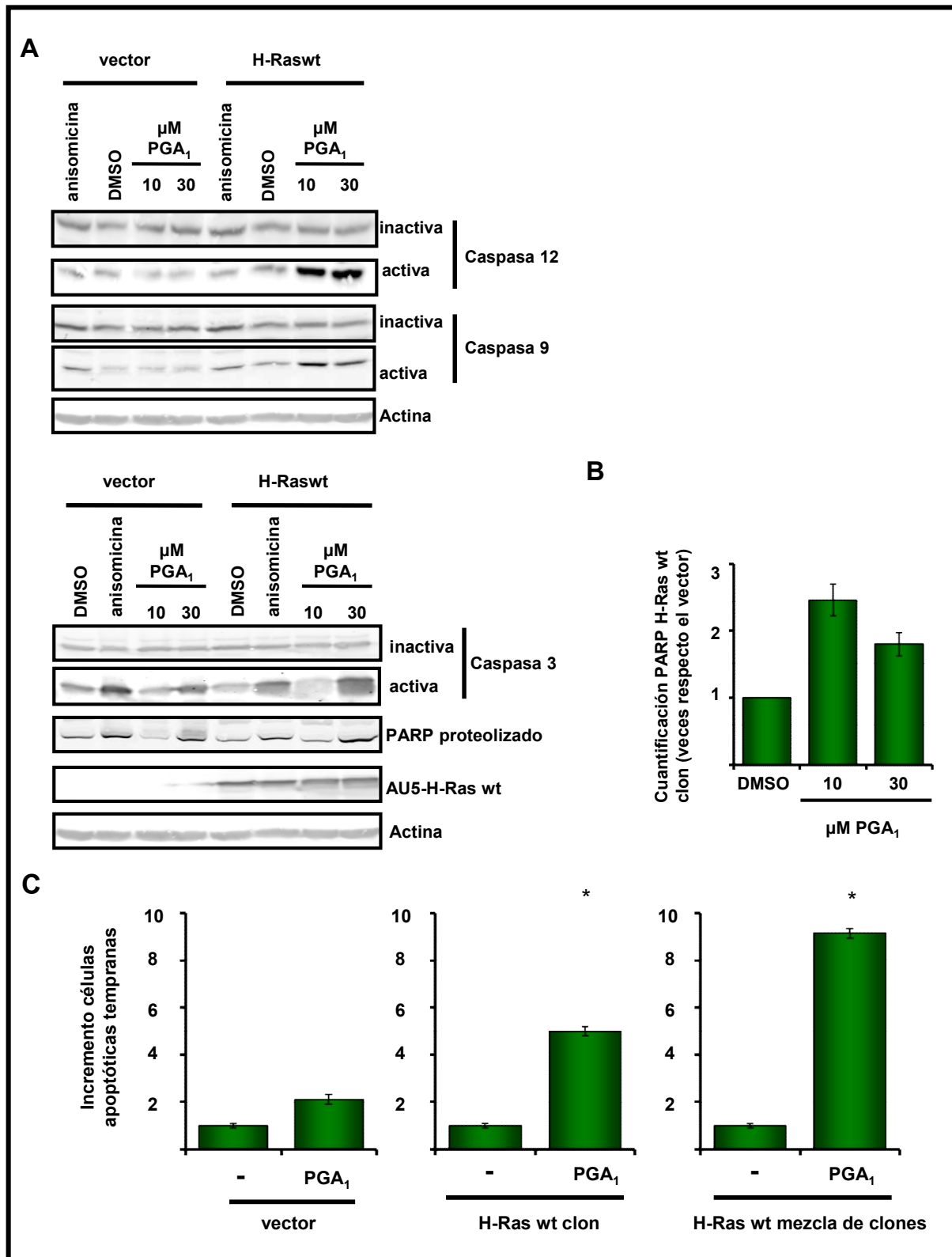


Figura 38. Activación de ERK por PGA_1 en MEFs wt, H-Ras $-/-$, N-Ras $-/-$ y doble KO H- y N- Ras $-/-$. Detección de la fosforilación de ERK en MEFs tratados durante 15 minutos con 50 $\mu\text{g/ml}$ FGF o PGA_1 10 o 30 μM .

Estos resultados sugieren que H- y N-Ras podrían ser necesarios para que se produzca la apoptosis por PGA_1 . Para comprobar esta hipótesis, analizamos la apoptosis ocasionada por PGA_1 en un clon de células NIH3T3 transfectadas establemente con H-Ras wt y la comparamos con la producida en células transfectadas con vector vacío. La sobre-expresión de H-Ras wt genera un incremento en la activación de caspasa 12, 9, 3, y en la proteólisis de su sustrato PARP, después del tratamiento con PGA_1 , respecto a las células transfectadas con vector (Figura 39A y B). Mediante citometría de flujo de células teñidas con anexina V e IP, comprobamos el aumento en la inducción de apoptosis mediada por H-Ras tras la estimulación con PGA_1 . Para ello utilizamos el mismo clon celular analizado por WB, y una mezcla heterogénea de clones que sobre-expresan H-Ras wt. La sobre-expresión de H-Ras wt produce un incremento en el porcentaje de células apoptóticas tempranas tras el tratamiento con PGA_1 (Figura 39D). Nuestros resultados demuestran que H-Ras wt potencia la apoptosis inducida por PGA_1 .



Para determinar si la ruta efectora de inducción de apoptosis es la ruta Raf-MEK-ERK, empleamos el inhibidor de MEK U0126, con el cual se bloquea la activación de ERK. El tratamiento con U0126 reduce la activación de ERK por FGF y PGA_1 en MEFs wt y no induce apoptosis (Figura 40). Tras el tratamiento con U0126 se produce una disminución en los niveles de caspasa 3 activa inducida por PGA_1 . Este resultado sugiere que la vía Raf-MEK-ERK está implicada en la apoptosis inducida por PGA_1 .

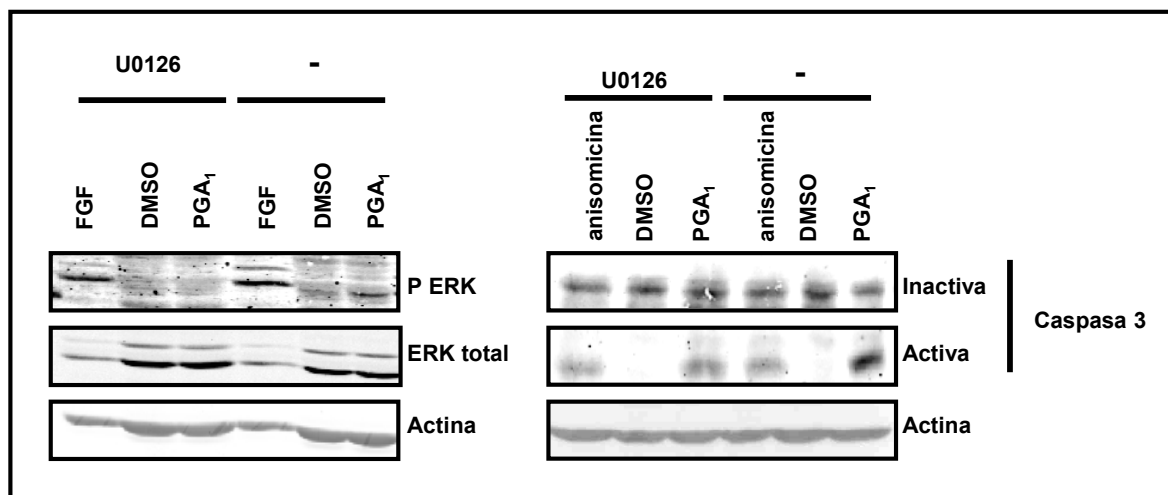


Figura 40. Efectos de la inhibición de la vía Raf-MEK-ERK en la inducción de apoptosis por PGA_1 . WB en el que se muestra la activación de ERK y caspasas. En estos ensayos tratamos MEFs con el inhibidor de MEK U0126 durante 1 hora a concentración 6 μM , y posteriormente co-tratamos con el inhibidor y PGA_1 10 μM o 50 ng/ml FGF durante 15 minutos para analizar la fosforilación de ERK, y durante 3 horas para analizar la activación de caspasas. Este ensayo es representativo de tres ensayos independientes hechos de manera similar, en los que obtuvimos el mismo resultado.

Nuestros resultados demuestran que la activación de las proteínas H- y N-Ras por PGA_1 induce apoptosis en fibroblastos. Así, las células NIH3T3 sufren apoptosis en respuesta a PGA_1 (Figura 35), y la sobreexpresión H-Ras wt en células NIH3T3 incrementa la apoptosis respecto a las células control (Figura 39). Sin embargo, PGA_1 no induce apoptosis en los MEFs que carecen de H- y N- Ras (Figura 37). Además, Ras se activa, en respuesta a PGA_1 , principalmente en retículo endoplásmico y aparato de Golgi (Figuras 30 y 31) y pensamos que el proceso apoptótico originado por PGA_1 comienza en el retículo endoplásmico, dada la activación de caspasa 12 inducida por PGA_1 (Figura 35). Asimismo, la sobre-expresión de Ras en estas regiones de endomembranas aumenta la activación de ERK (Figura 32) [lo cual es dependiente de Ras (Figura 20)], mientras que la inhibición de ERK disminuye la apoptosis inducida por PGA_1 (Figura 40).

Actualmente no conocemos con exactitud el mecanismo molecular implicado en la generación de apoptosis por PGA_1 , dependiente de la activación de las proteínas H- y N-Ras en compartimentos de endomembranas (retículo endoplásmico y aparato de Golgi). Es posible que intervenga la generación de ROS, apoyada esta opción por el dato de la mayor producción de ROS por H-Ras V12 que por K-Ras V12 (Santillo et al., 2001) y la protección que ejerce el NGF (inductor de tioredoxina) en la apoptosis ocasionada por PGA_1 en células PC12 (la cual es debida a la inhibición de tioredoxina por PGA_1) (Bai et al., 2003; Tonge et al., 2008); además, se ha descrito que la formación de ROS induce apoptosis dependiente de retículo endoplásmico (McCullough et al., 2001) y que la co-estimulación con $\text{TNF}\alpha$ y PGA_1 (Bureau et al., 2002) o PGA_2 (Kondo et al., 2001), inducen la formación de ROS por un mecanismo no descrito. En contra de esta posibilidad están las evidencias de que la diferente producción de ROS entre H-Ras V12 y K-Ras V12 se debe a su distinta localización: mientras K-Ras localizado en mitocondrias estimula a la enzima Mn-SOD, la cual disminuye la concentración de ROS; H-Ras activado en membrana plasmática activa a ERK, induciendo la estimulación de la NADPH-oxidasa y generando altas concentraciones de ROS; ya que nuestros resultados muestran que la principal activación de H-Ras por PGA_1 ocurre en retículo endoplásmico, y en aparato de Golgi, no en membrana plasmática.

Otra opción podría ser que la activación específica y transitoria de H y N-Ras por PGA_1 en retículo endoplásmico y aparato de Golgi active efectores específicos, aún no identificados, en estas localizaciones intra-celulares (y diferentes de los inducidos en otros compartimentos de membrana) que induzcan la estimulación de la caspasa 12, bien directamente o a través de un determinado patrón transcripcional. Así, la activación de Ras en el aparato de Golgi por óxido nítrico (molécula que activa a Ras con características similares a PGA_1), también induce apoptosis en células T por un mecanismo no descrito (Ibiza et al., 2008). Nuestros resultados difieren de los efectos biológicos que han encontrado otros autores, los cuales al anclar Ras hiperactivo al retículo endoplásmico o aparato de Golgi, encontraron un aumento en la supervivencia y proliferación celular, respectivamente (Matallanas et al., 2006). Pensamos que la diferencia con nuestros resultados, se debe a que la estimulación con PGA_1 produce una estimulación transitoria de Ras. La activación sostenida de Ras produciría un contexto bioquímico diferente al de células normales. Así, se ha descrito que la activación sostenida de ERK induce la interacción sucesiva con diferentes residuos de c-Fos, lo que ocasiona un aumento en su actividad inductora de genes de transcripción temprana (o IEGs) (Murphy et al., 2002), mientras que una activación

transitoria de ERK no mantiene la estabilidad de c-Fos, ni puede unirse a todos los residuos de interacción (es necesaria una unión sucesiva) por lo que no se consigue una funcionalidad total de c-Fos, y no se induce la transcripción de IEGs. Así, la activación sostenida de ERK, originaría la transcripción de IEGs, y con ello un contexto bioquímico diferente en las células que expresan Ras hiperactivo, respecto a las células normales. Estas diferencias en el contexto bioquímico podría propiciar diferencias en la interacción de Ras con efectores, lo cual a su vez podría ocasionar distintos efectos celulares. Por otro lado, PGA_1 interacciona con otras moléculas del interior celular, lo cual podría modificar la disponibilidad o facilidad de interacción con los efectores de Ras.

CONCLUSIONES

1. PGA_1 se une a las proteínas H-, N- y K- Ras. La unión a H-Ras ocurre en las cisteínas 118 y 184, siendo mayoritaria la modificación en el residuo 118.
2. PGA_1 activa a las proteínas H-, N- y K-Ras. La mutación de la cisteína 118 a serina ocasiona una disminución en la activación de Ras por PGA_1 . La mutación de la cisteína 184 a serina ocasiona un aumento en la estimulación de Ras por PGA_1 .
3. Nuestros resultados sugieren que la unión y activación de PGA_1 a Ras ocurre sin necesidad de GTP.
4. La activación de ERK inducida por PGA_1 es dependiente de las proteínas Ras.
5. El óxido nítrico activa a las tres isoformas de las proteínas Ras.
6. El óxido nítrico induce una disminución de la dimetilación de las lisinas 4 y 9 de la histona H3 y una ligera disminución de la trimetilación de la lisina 20 de la histona H4.
7. PGA_1 y óxido nítrico activan a Ras en retículo endoplásmico y aparato de Golgi.
8. PGA_1 , al coestimular con NGF, incrementa el número de células PC12 diferenciadas y aumenta la longitud de sus neuritas.
9. La activación de H- y N- Ras por PGA_1 induce apoptosis en células NIH3T3 y fibroblastos embrionarios de ratón.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, J. M., and Cory, S. (1991). Transgenic models of tumor development. *Science* *254*, 1161-1167.
- Adjei, A. A. (2001). Blocking oncogenic Ras signaling for cancer therapy. *J Natl Cancer Inst* *93*, 1062-1074.
- Agudo-Ibanez, L., Nunez, F., Calvo, F., Berenjeno, I. M., Bustelo, X. R., and Crespo, P. (2007). Transcriptomal profiling of site-specific Ras signals. *Cell Signal* *19*, 2264-2276.
- Aldini, G., Carini, M., Vistoli, G., Shibata, T., Kusano, Y., Gamberoni, L., Dalle-Donne, I., Milzani, A., and Uchida, K. (2007). Identification of actin as a 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 target in neuroblastoma cells: mass spectrometric, computational, and functional approaches to investigate the effect on cytoskeletal derangement. *Biochemistry* *46*, 2707-2718.
- Alessi, D. R., Deak, M., Casamayor, A., Caudwell, F. B., Morrice, N., Norman, D. G., Gaffney, P., Reese, C. B., MacDougall, C. N., Harbison, D., *et al.* (1997). 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1): structural and functional homology with the *Drosophila* DSTPK61 kinase. *Curr Biol* *7*, 776-789.
- Alexandrova, A. Y., Kopnin, P. B., Vasiliev, J. M., and Kopnin, B. P. (2006). ROS up-regulation mediates Ras-induced changes of cell morphology and motility. *Exp Cell Res* *312*, 2066-2073.
- Amaravadi, R., and Thompson, C. B. (2005). The survival kinases Akt and Pim as potential pharmacological targets. *J Clin Invest* *115*, 2618-2624.
- Arikawa, E., Cheung, C., Sekirov, I., Battell, M. L., Yuen, V. G., and McNeill, J. H. (2006). Effects of endothelin receptor blockade on hypervasoreactivity in streptozotocin-diabetic rats: vessel-specific involvement of thromboxane A2. *Can J Physiol Pharmacol* *84*, 823-833.
- Arozarena, I., Matallanas, D., Berciano, M. T., Sanz-Moreno, V., Calvo, F., Munoz, M. T., Egea, G., Lafarga, M., and Crespo, P. (2004). Activation of H-Ras in the endoplasmic reticulum by the RasGRF family guanine nucleotide exchange factors. *Mol Cell Biol* *24*, 1516-1530.
- Bai, J., Nakamura, H., Kwon, Y. W., Hattori, I., Yamaguchi, Y., Kim, Y. C., Kondo, N., Oka, S., Ueda, S., Masutani, H., and Yodoi, J. (2003). Critical roles of thioredoxin in nerve growth factor-mediated signal transduction and neurite outgrowth in PC12 cells. *J Neurosci* *23*, 503-509.

- Balmain, A., Ramsden, M., Bowden, G. T., and Smith, J. (1984). Activation of the mouse cellular Harvey-ras gene in chemically induced benign skin papillomas. *Nature* 307, 658-660.
- Bernstein, B. E., Kamal, M., Lindblad-Toh, K., Bekiranov, S., Bailey, D. K., Huebert, D. J., McMahon, S., Karlsson, E. K., Kulbokas, E. J., 3rd, Gingeras, T. R., *et al.* (2005). Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse. *Cell* 120, 169-181.
- Bivona, T. G., Perez De Castro, I., Ahearn, I. M., Grana, T. M., Chiu, V. K., Lockyer, P. J., Cullen, P. J., Pellicer, A., Cox, A. D., and Philips, M. R. (2003). Phospholipase Cgamma activates Ras on the Golgi apparatus by means of RasGRP1. *Nature* 424, 694-698.
- Bivona, T. G., Quatela, S. E., Bodemann, B. O., Ahearn, I. M., Soskis, M. J., Mor, A., Miura, J., Wiener, H. H., Wright, L., Saba, S. G., *et al.* (2006). PKC regulates a farnesyl-electrostatic switch on K-Ras that promotes its association with Bcl-XL on mitochondria and induces apoptosis. *Mol Cell* 21, 481-493.
- Blank, M., and Shiloh, Y. (2007). Programs for cell death: apoptosis is only one way to go. *Cell Cycle* 6, 686-695.
- Bogdan, C. (2001). Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* 2, 907-916.
- Boglari, G., Erhardt, P., Cooper, G. M., and Szeberenyi, J. (1998). Intact Ras function is required for sustained activation and nuclear translocation of extracellular signal-regulated kinases in nerve growth factor-stimulated PC12 cells. *Eur J Cell Biol* 75, 54-58.
- Bonni, A., Brunet, A., West, A. E., Datta, S. R., Takasu, M. A., and Greenberg, M. E. (1999). Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science* 286, 1358-1362.
- Boriack-Sjodin, P. A., Margarit, S. M., Bar-Sagi, D., and Kuriyan, J. (1998). The structural basis of the activation of Ras by Sos. *Nature* 394, 337-343.
- Bos, J. L. (1989). ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 49, 4682-4689.
- Bredt, D. S., Glatt, C. E., Hwang, P. M., Fotuhi, M., Dawson, T. M., and Snyder, S. H. (1991a). Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. *Neuron* 7, 615-624.
- Bredt, D. S., Hwang, P. M., Glatt, C. E., Lowenstein, C., Reed, R. R., and Snyder, S. H. (1991b). Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* 351, 714-718.

- Brunger, A. T., Milburn, M. V., Tong, L., deVos, A. M., Jancarik, J., Yamaizumi, Z., Nishimura, S., Ohtsuka, E., and Kim, S. H. (1990). Crystal structure of an active form of RAS protein, a complex of a GTP analog and the HRAS p21 catalytic domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* *87*, 4849-4853.
- Bureau, F., Desmet, C., Melotte, D., Jaspar, F., Volanti, C., Vanderplasschen, A., Pastoret, P. P., Piette, J., and Lekeux, P. (2002). A proinflammatory role for the cyclopentenone prostaglandins at low micromolar concentrations: oxidative stress-induced extracellular signal-regulated kinase activation without NF-kappa B inhibition. *J Immunol* *168*, 5318-5325.
- Burlacu, A. (2003). Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. *J Cell Mol Med* *7*, 249-257.
- Carpenter, C. L., and Cantley, L. C. (1996). Phosphoinositide kinases. *Curr Opin Cell Biol* *8*, 153-158.
- Castellano, E., De Las Rivas, J., Guerrero, C., and Santos, E. (2007). Transcriptional networks of knockout cell lines identify functional specificities of H-Ras and N-Ras: significant involvement of N-Ras in biotic and defense responses. *Oncogene* *26*, 917-933.
- Castrillo, A., Diaz-Guerra, M. J., Hortelano, S., Martin-Sanz, P., and Bosca, L. (2000). Inhibition of IkappaB kinase and IkappaB phosphorylation by 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2) in activated murine macrophages. *Mol Cell Biol* *20*, 1692-1698.
- Cernuda-Morollon, E., Pineda-Molina, E., Canada, F. J., and Perez-Sala, D. (2001). 15-Deoxy-Delta 12,14-prostaglandin J2 inhibition of NF-kappaB-DNA binding through covalent modification of the p50 subunit. *J Biol Chem* *276*, 35530-35536.
- Cloos, P. A., Christensen, J., Agger, K., Maiolica, A., Rappsilber, J., Antal, T., Hansen, K. H., and Helin, K. (2006). The putative oncogene GASC1 demethylates tri- and dimethylated lysine 9 on histone H3. *Nature* *442*, 307-311.
- Colicelli, J., Nicolette, C., Birchmeier, C., Rodgers, L., Riggs, M., and Wigler, M. (1991). Expression of three mammalian cDNAs that interfere with RAS function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *88*, 2913-2917.
- Costa, E. T., Forti, F. L., Matos, T. G., Dermargos, A., Nakano, F., Salotti, J., Rocha, K. M., Asprino, P. F., Yoshihara, C. K., Koga, M. M., and Armelin, H. A. (2008). Fibroblast growth factor 2 restrains Ras-driven proliferation of malignant cells by triggering RhoA-mediated senescence. *Cancer Res* *68*, 6215-6223.
- Coussens, L. M., and Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature* *420*, 860-867.
- Cox, A. D., and Der, C. J. (2003). The dark side of Ras: regulation of apoptosis. *Oncogene* *22*, 8999-9006.

- Crespo, P., and Leon, J. (2000). Ras proteins in the control of the cell cycle and cell differentiation. *Cell Mol Life Sci* 57, 1613-1636.
- Crespo, P., Xu, N., Simonds, W. F., and Gutkind, J. S. (1994). Ras-dependent activation of MAP kinase pathway mediated by G-protein beta gamma subunits. *Nature* 369, 418-420.
- Crissman, H. A., Darzynkiewicz, Z., Steinkamp, J. A., and Tobey, R. A. (1990). Simultaneous fluorescent labeling of DNA, RNA, and protein. *Methods Cell Biol* 33, 305-314.
- Cuda, G., Paterno, R., Ceravolo, R., Candigliota, M., Perrotti, N., Perticone, F., Faniello, M. C., Schepis, F., Ruocco, A., Mele, E., *et al.* (2002). Protection of human endothelial cells from oxidative stress: role of Ras-ERK1/2 signaling. *Circulation* 105, 968-974.
- Chen, C. H., Wang, W. J., Kuo, J. C., Tsai, H. C., Lin, J. R., Chang, Z. F., and Chen, R. H. (2005). Bidirectional signals transduced by DAPK-ERK interaction promote the apoptotic effect of DAPK. *Embo J* 24, 294-304.
- Chiu, V. K., Bivona, T., Hach, A., Sajous, J. B., Silletti, J., Wiener, H., Johnson, R. L., 2nd, Cox, A. D., and Philips, M. R. (2002). Ras signalling on the endoplasmic reticulum and the Golgi. *Nat Cell Biol* 4, 343-350.
- Choi, J. A., Park, M. T., Kang, C. M., Um, H. D., Bae, S., Lee, K. H., Kim, T. H., Kim, J. H., Cho, C. K., Lee, Y. S., *et al.* (2004). Opposite effects of Ha-Ras and Ki-Ras on radiation-induced apoptosis via differential activation of PI3K/Akt and Rac/p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Oncogene* 23, 9-20.
- Choy, E., Chiu, V. K., Silletti, J., Feoktistov, M., Morimoto, T., Michaelson, D., Ivanov, I. E., and Philips, M. R. (1999). Endomembrane trafficking of ras: the CAAX motif targets proteins to the ER and Golgi. *Cell* 98, 69-80.
- Chuang, J. I., Chang, T. Y., and Liu, H. S. (2003). Glutathione depletion-induced apoptosis of Ha-ras-transformed NIH3T3 cells can be prevented by melatonin. *Oncogene* 22, 1349-1357.
- de Bittencourt, P. I., Jr., Miyasaka, C. K., Curi, R., and Williams, J. F. (1998). Effects of the antiproliferative cyclopentenone prostaglandin A1 on glutathione metabolism in human cancer cells in culture. *Biochem Mol Biol Int* 45, 1255-1264.
- de Vos, A. M., Tong, L., Milburn, M. V., Matias, P. M., Jancarik, J., Noguchi, S., Nishimura, S., Miura, K., Ohtsuka, E., and Kim, S. H. (1988). Three-dimensional structure of an oncogene protein: catalytic domain of human c-H-ras p21. *Science* 239, 888-893.
- Deak, M., Clifton, A. D., Lucocq, L. M., and Alessi, D. R. (1998). Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB. *Embo J* 17, 4426-4441.

- del Peso, L., Gonzalez-Garcia, M., Page, C., Herrera, R., and Nunez, G. (1997). Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* 278, 687-689.
- Denis, G. V., Yu, Q., Ma, P., Deeds, L., Faller, D. V., and Chen, C. Y. (2003). Bcl-2, via its BH4 domain, blocks apoptotic signaling mediated by mitochondrial Ras. *J Biol Chem* 278, 5775-5785.
- Deora, A. A., Hajjar, D. P., and Lander, H. M. (2000). Recruitment and activation of Raf-1 kinase by nitric oxide-activated Ras. *Biochemistry* 39, 9901-9908.
- Deora, A. A., Win, T., Vanhaesebroeck, B., and Lander, H. M. (1998). A redox-triggered ras-effector interaction. Recruitment of phosphatidylinositol 3'-kinase to Ras by redox stress. *J Biol Chem* 273, 29923-29928.
- Doheny, H. C., O'Reilly, M. J., Sexton, D. J., and Morrison, J. J. (2007). THG113.31, a specific PGF2alpha receptor antagonist, induces human myometrial relaxation and BKCa channel activation. *Reprod Biol Endocrinol* 5, 10.
- Dong, C., Waters, S. B., Holt, K. H., and Pessin, J. E. (1996). SOS phosphorylation and disassociation of the Grb2-SOS complex by the ERK and JNK signaling pathways. *J Biol Chem* 271, 6328-6332.
- Downward, J., Graves, J. D., Warne, P. H., Rayter, S., and Cantrell, D. A. (1990). Stimulation of p21ras upon T-cell activation. *Nature* 346, 719-723.
- Ehrhardt, A., David, M. D., Ehrhardt, G. R., and Schrader, J. W. (2004). Distinct mechanisms determine the patterns of differential activation of H-Ras, N-Ras, K-Ras 4B, and M-Ras by receptors for growth factors or antigen. *Mol Cell Biol* 24, 6311-6323.
- Erl, W., Weber, C., Zerneck, A., Neuzil, J., Vosseler, C. A., Kim, H. J., and Weber, P. C. (2004). Cyclopentenone prostaglandins induce endothelial cell apoptosis independent of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Eur J Immunol* 34, 241-250.
- Esteban, L. M., Vicario-Abejon, C., Fernandez-Salguero, P., Fernandez-Medarde, A., Swaminathan, N., Yienger, K., Lopez, E., Malumbres, M., McKay, R., Ward, J. M., *et al.* (2001). Targeted genomic disruption of H-ras and N-ras, individually or in combination, reveals the dispensability of both loci for mouse growth and development. *Mol Cell Biol* 21, 1444-1452.
- Formstecher, E., Ramos, J. W., Fauquet, M., Calderwood, D. A., Hsieh, J. C., Canton, B., Nguyen, X. T., Barnier, J. V., Camonis, J., Ginsberg, M. H., and Chneiweiss, H. (2001). PEA-15 mediates cytoplasmic sequestration of ERK MAP kinase. *Dev Cell* 1, 239-250.
- Frankel, P., Ramos, M., Flom, J., Bychenok, S., Joseph, T., Kerkhoff, E., Rapp, U. R., Feig, L. A., and Foster, D. A. (1999). Ral and Rho-dependent activation of phospholipase D in v-Raf-transformed cells. *Biochem Biophys Res Commun* 255, 502-507.

- Friebe, A., and Koesling, D. (2003). Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Circ Res* 93, 96-105.
- Galluzzi, L., Maiuri, M. C., Vitale, I., Zischka, H., Castedo, M., Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2007). Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ* 14, 1237-1243.
- Gavin, A. C., and Nebreda, A. R. (1999). A MAP kinase docking site is required for phosphorylation and activation of p90(rsk)/MAPKAP kinase-1. *Curr Biol* 9, 281-284.
- Gayarre, J., Stamatakis, K., Renedo, M., and Perez-Sala, D. (2005). Differential selectivity of protein modification by the cyclopentenone prostaglandins PGA1 and 15-deoxy-Delta12,14-PGJ2: role of glutathione. *FEBS Lett* 579, 5803-5808.
- Gharbi, S., Garzon, B., Gayarre, J., Timms, J., and Perez-Sala, D. (2007). Study of protein targets for covalent modification by the antitumoral and anti-inflammatory prostaglandin PGA1: focus on vimentin. *J Mass Spectrom* 42, 1474-1484.
- Gibbs, J. B., Marshall, M. S., Scolnick, E. M., Dixon, R. A., and Vogel, U. S. (1990). Modulation of guanine nucleotides bound to Ras in NIH3T3 cells by oncogenes, growth factors, and the GTPase activating protein (GAP). *J Biol Chem* 265, 20437-20442.
- Giovannardi, S., Forlani, G., Balestrini, M., Bossi, E., Tonini, R., Sturani, E., Peres, A., and Zippel, R. (2002). Modulation of the inward rectifier potassium channel IRK1 by the Ras signaling pathway. *J Biol Chem* 277, 12158-12163.
- Goi, T., Shipitsin, M., Lu, Z., Foster, D. A., Klinz, S. G., and Feig, L. A. (2000). An EGF receptor/Ral-GTPase signaling cascade regulates c-Src activity and substrate specificity. *Embo J* 19, 623-630.
- Goodwin, J. S., Drake, K. R., Rogers, C., Wright, L., Lippincott-Schwartz, J., Phillips, M. R., and Kenworthy, A. K. (2005). Depalmitoylated Ras traffics to and from the Golgi complex via a nonvesicular pathway. *J Cell Biol* 170, 261-272.
- Gorfe, A. A., Hanzal-Bayer, M., Abankwa, D., Hancock, J. F., and McCammon, J. A. (2007). Structure and dynamics of the full-length lipid-modified H-Ras protein in a 1,2-dimyristoylglycero-3-phosphocholine bilayer. *J Med Chem* 50, 674-684.
- Gupta, D., Syed, N. A., Roesler, W. J., and Khandelwal, R. L. (2004). Effect of overexpression and nuclear translocation of constitutively active PKB-alpha on cellular survival and proliferation in HepG2 cells. *J Cell Biochem* 93, 513-525.
- Gupta, S., Seth, A., and Davis, R. J. (1993). Transactivation of gene expression by Myc is inhibited by mutation at the phosphorylation sites Thr-58 and Ser-62. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 3216-3220.

- Gureasko, J., Galush, W. J., Boykevich, S., Sondermann, H., Bar-Sagi, D., Groves, J. T., and Kuriyan, J. (2008). Membrane-dependent signal integration by the Ras activator Son of sevenless. *Nat Struct Mol Biol* 15, 452-461.
- Hall, A., Billinton, A., and Giblin, G. M. (2007). EP1 antagonists for the treatment of inflammatory pain. *Curr Opin Drug Discov Devel* 10, 597-612.
- Hall, B. E., Yang, S. S., Boriack-Sjodin, P. A., Kuriyan, J., and Bar-Sagi, D. (2001). Structure-based mutagenesis reveals distinct functions for Ras switch 1 and switch 2 in Sos-catalyzed guanine nucleotide exchange. *J Biol Chem* 276, 27629-27637.
- Hancock, J. F. (2006). Lipid rafts: contentious only from simplistic standpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 456-462.
- Hancock, J. F., Cadwallader, K., and Marshall, C. J. (1991a). Methylation and proteolysis are essential for efficient membrane binding of prenylated p21K-ras(B). *Embo J* 10, 641-646.
- Hancock, J. F., Cadwallader, K., Paterson, H., and Marshall, C. J. (1991b). A CAAX or a CAAL motif and a second signal are sufficient for plasma membrane targeting of ras proteins. *Embo J* 10, 4033-4039.
- Hancock, J. F., Magee, A. I., Childs, J. E., and Marshall, C. J. (1989). All ras proteins are polyisoprenylated but only some are palmitoylated. *Cell* 57, 1167-1177.
- Hancock, J. F., Paterson, H., and Marshall, C. J. (1990). A polybasic domain or palmitoylation is required in addition to the CAAX motif to localize p21ras to the plasma membrane. *Cell* 63, 133-139.
- Hatazawa, R., Tanaka, A., Tanigami, M., Amagase, K., Kato, S., Ashida, Y., and Takeuchi, K. (2007). Cyclooxygenase-2/prostaglandin E2 accelerates the healing of gastric ulcers via EP4 receptors. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 293, G788-797.
- Hengartner, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407, 770-776.
- Henry, D. O., Moskalenko, S. A., Kaur, K. J., Fu, M., Pestell, R. G., Camonis, J. H., and White, M. A. (2000). Ral GTPases contribute to regulation of cyclin D1 through activation of NF-kappaB. *Mol Cell Biol* 20, 8084-8092.
- Heo, J., Prutzman, K. C., Mocanu, V., and Campbell, S. L. (2005). Mechanism of free radical nitric oxide-mediated Ras guanine nucleotide dissociation. *J Mol Biol* 346, 1423-1440.
- Herrmann, C., Martin, G. A., and Wittinghofer, A. (1995). Quantitative analysis of the complex between p21ras and the Ras-binding domain of the human Raf-1 protein kinase. *J Biol Chem* 270, 2901-2905.
- Hortelano, S., Castrillo, A., Alvarez, A. M., and Bosca, L. (2000). Contribution of cyclopentenone prostaglandins to the resolution of inflammation through the potentiation of apoptosis in activated macrophages. *J Immunol* 165, 6525-6531.

- Huang, L., Weng, X., Hofer, F., Martin, G. S., and Kim, S. H. (1997). Three-dimensional structure of the Ras-interacting domain of RalGDS. *Nat Struct Biol* 4, 609-615.
- Hubich, A. I., and Sholukh, M. V. (2006). Biochemistry of prostaglandins A. *Biochemistry (Mosc)* 71, 229-238.
- Ibiza, S., Perez-Rodriguez, A., Ortega, A., Martinez-Ruiz, A., Barreiro, O., Garcia-Dominguez, C. A., Victor, V. M., Esplugues, J. V., Rojas, J. M., Sanchez-Madrid, F., and Serrador, J. M. (2008). Endothelial nitric oxide synthase regulates N-Ras activation on the Golgi complex of antigen-stimulated T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 10507-10512.
- Ibiza, S., Victor, V. M., Bosca, I., Ortega, A., Urzainqui, A., O'Connor, J. E., Sanchez-Madrid, F., Esplugues, J. V., and Serrador, J. M. (2006). Endothelial nitric oxide synthase regulates T cell receptor signaling at the immunological synapse. *Immunity* 24, 753-765.
- Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E., and Chaudhuri, G. (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 9265-9269.
- Ise, K., Nakamura, K., Nakao, K., Shimizu, S., Harada, H., Ichise, T., Miyoshi, J., Gondo, Y., Ishikawa, T., Aiba, A., and Katsuki, M. (2000). Targeted deletion of the H-ras gene decreases tumor formation in mouse skin carcinogenesis. *Oncogene* 19, 2951-2956.
- Jeong, H. S., Kim, S. W., Baek, K. J., Lee, H. S., Kwon, N. S., Kim, Y. M., and Yun, H. Y. (2002). Involvement of Ras in survival responsiveness to nitric oxide toxicity in pheochromocytoma cells. *J Neurooncol* 60, 97-107.
- Johnson, L., Greenbaum, D., Cichowski, K., Mercer, K., Murphy, E., Schmitt, E., Bronson, R. T., Umanoff, H., Edelman, W., Kucherlapati, R., and Jacks, T. (1997). K-ras is an essential gene in the mouse with partial functional overlap with N-ras. *Genes Dev* 11, 2468-2481.
- Jorge, R., Zarich, N., Oliva, J. L., Azanedo, M., Martinez, N., de la Cruz, X., and Rojas, J. M. (2002). HSos1 contains a new amino-terminal regulatory motif with specific binding affinity for its pleckstrin homology domain. *J Biol Chem* 277, 44171-44179.
- Kabashima, K., Sakata, D., Nagamachi, M., Miyachi, Y., Inaba, K., and Narumiya, S. (2003). Prostaglandin E2-EP4 signaling initiates skin immune responses by promoting migration and maturation of Langerhans cells. *Nat Med* 9, 744-749.
- Kaneko, I., Hishinuma, T., Suzuki, K., Owada, Y., Kitanaka, N., Kondo, H., Goto, J., Furukawa, H., and Ono, M. (2008). Prostaglandin F(2alpha) regulates cytokine responses of mast cells through the receptors for prostaglandin E. *Biochem Biophys Res Commun* 367, 590-596.
- Karin, M. (2005). Inflammation and cancer: the long reach of Ras. *Nat Med* 11, 20-21.

- Kelley, G. G., Reks, S. E., Ondrako, J. M., and Smrcka, A. V. (2001). Phospholipase C(epsilon): a novel Ras effector. *Embo J* 20, 743-754.
- Khokhlatchev, A., Rabizadeh, S., Xavier, R., Nedwidek, M., Chen, T., Zhang, X. F., Seed, B., and Avruch, J. (2002). Identification of a novel Ras-regulated proapoptotic pathway. *Curr Biol* 12, 253-265.
- Kikuchi, A., and Williams, L. T. (1994). The post-translational modification of ras p21 is important for Raf-1 activation. *J Biol Chem* 269, 20054-20059.
- Kim, W. J., Kim, J. H., and Jang, S. K. (2007). Anti-inflammatory lipid mediator 15d-PGJ2 inhibits translation through inactivation of eIF4A. *Embo J* 26, 5020-5032.
- Kondo, M., Oya-Ito, T., Kumagai, T., Osawa, T., and Uchida, K. (2001). Cyclopentenone prostaglandins as potential inducers of intracellular oxidative stress. *J Biol Chem* 276, 12076-12083.
- Krab, L. C., Goorden, S. M., and Elgersma, Y. (2008). Oncogenes on my mind: ERK and MTOR signaling in cognitive diseases. *Trends Genet* 24, 498-510.
- Kumar, V., Zhang, M. X., Swank, M. W., Kunz, J., and Wu, G. Y. (2005). Regulation of dendritic morphogenesis by Ras-PI3K-Akt-mTOR and Ras-MAPK signaling pathways. *J Neurosci* 25, 11288-11299.
- Kumazawa, M., Iida, H., Uchida, M., Iida, M., Takenaka, M., and Dohi, S. (2007). The comparative effects of intravenous nicardipine and prostaglandin E1 on the cerebral pial arteriolar constriction seen after unclamping of an aortic cross-clamp in rabbits. *Anesth Analg* 104, 659-665.
- Lambert, J. M., Lambert, Q. T., Reuther, G. W., Malliri, A., Siderovski, D. P., Sondek, J., Collard, J. G., and Der, C. J. (2002). Tiam1 mediates Ras activation of Rac by a PI(3)K-independent mechanism. *Nat Cell Biol* 4, 621-625.
- Lander, H. M. (1996). Cellular Activation Mediated by Nitric Oxide. *Methods* 10, 15-20.
- Lander, H. M., Jacovina, A. T., Davis, R. J., and Tauras, J. M. (1996). Differential activation of mitogen-activated protein kinases by nitric oxide-related species. *J Biol Chem* 271, 19705-19709.
- Lander, H. M., Ogiste, J. S., Pearce, S. F., Levi, R., and Novogrodsky, A. (1995a). Nitric oxide-stimulated guanine nucleotide exchange on p21ras. *J Biol Chem* 270, 7017-7020.
- Lander, H. M., Ogiste, J. S., Teng, K. K., and Novogrodsky, A. (1995b). p21ras as a common signaling target of reactive free radicals and cellular redox stress. *J Biol Chem* 270, 21195-21198.
- Lander, H. M., Sehajpal, P. K., and Novogrodsky, A. (1993). Nitric oxide signaling: a possible role for G proteins. *J Immunol* 151, 7182-7187.

- Lassus, P., and Hibner, U. (1998). Detection and quantification of apoptosis in transiently transfected adherent cells. *Nucleic Acids Res* 26, 5233-5234.
- Lazarus, M., Yoshida, K., Coppari, R., Bass, C. E., Mochizuki, T., Lowell, B. B., and Saper, C. B. (2007). EP3 prostaglandin receptors in the median preoptic nucleus are critical for fever responses. *Nat Neurosci* 10, 1131-1133.
- Leist, M., and Jaattela, M. (2001). Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 589-598.
- Liu, J. D., Lin, S. Y., Ho, Y. S., Pan, S., Hung, L. F., Tsai, S. H., Lin, J. K., and Liang, Y. C. (2003). Involvement of c-jun N-terminal kinase activation in 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2-and prostaglandin A1-induced apoptosis in AGS gastric epithelial cells. *Mol Carcinog* 37, 16-24.
- Lizcano, J. M., Morrice, N., and Cohen, P. (2000). Regulation of BAD by cAMP-dependent protein kinase is mediated via phosphorylation of a novel site, Ser155. *Biochem J* 349, 547-557.
- Malumbres, M., and Pellicer, A. (1998). RAS pathways to cell cycle control and cell transformation. *Front Biosci* 3, d887-912.
- Mandal, A. K., Zhang, Z., Kim, S. J., Tsai, P. C., and Mukherjee, A. B. (2005). Yin-yang: balancing act of prostaglandins with opposing functions to regulate inflammation. *J Immunol* 175, 6271-6273.
- Marais, R., Wynne, J., and Treisman, R. (1993). The SRF accessory protein Elk-1 contains a growth factor-regulated transcriptional activation domain. *Cell* 73, 381-393.
- Marinissen, M. J., Chiariello, M., Pallante, M., and Gutkind, J. S. (1999). A network of mitogen-activated protein kinases links G protein-coupled receptors to the c-jun promoter: a role for c-Jun NH2-terminal kinase, p38s, and extracellular signal-regulated kinase 5. *Mol Cell Biol* 19, 4289-4301.
- Martinez-Balbas, M. A., Bannister, A. J., Martin, K., Haus-Seuffert, P., Meisterernst, M., and Kouzarides, T. (1998). The acetyltransferase activity of CBP stimulates transcription. *Embo J* 17, 2886-2893.
- Martinez-Ruiz, A., and Lamas, S. (2004). S-nitrosylation: a potential new paradigm in signal transduction. *Cardiovasc Res* 62, 43-52.
- Matallanas, D., Sanz-Moreno, V., Arozarena, I., Calvo, F., Agudo-Ibanez, L., Santos, E., Berciano, M. T., and Crespo, P. (2006). Distinct utilization of effectors and biological outcomes resulting from site-specific Ras activation: Ras functions in lipid rafts and Golgi complex are dispensable for proliferation and transformation. *Mol Cell Biol* 26, 100-116.

- McCullough, K. D., Martindale, J. L., Klotz, L. O., Aw, T. Y., and Holbrook, N. J. (2001). Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol* 21, 1249-1259.
- Mebratu, Y. A., Dickey, B. F., Evans, C., and Tesfaigzi, Y. (2008). The BH3-only protein Bik/Blk/Nbk inhibits nuclear translocation of activated ERK1/2 to mediate IFNgamma-induced cell death. *J Cell Biol* 183, 429-439.
- Michael D. Oberst, S. B., Juan Juan Yin, Yvona Ward and Kathleen Kelly (2005). Transcription and pathway profiling of H-Ras-mediated transformation of immortalized human mammary epithelial cells. *Proc Amer Assoc Cancer Res* 46.
- Millan, O., Ballester, A., Castrillo, A., Oliva, J. L., Traves, P. G., Rojas, J. M., and Bosca, L. (2003). H-Ras-specific activation of NF-kappaB protects NIH 3T3 cells against stimulus-dependent apoptosis. *Oncogene* 22, 477-483.
- Millan, O., Rico, D., Peinado, H., Zarich, N., Stamatakis, K., Perez-Sala, D., Rojas, J. M., Cano, A., and Bosca, L. (2006). Potentiation of tumor formation by topical administration of 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2 in a model of skin carcinogenesis. *Carcinogenesis* 27, 328-336.
- Mollace, V., Muscoli, C., Masini, E., Cuzzocrea, S., and Salvemini, D. (2005). Modulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide and nitric oxide donors. *Pharmacol Rev* 57, 217-252.
- Mor, A., and Philips, M. R. (2006). Compartmentalized Ras/MAPK signaling. *Annu Rev Immunol* 24, 771-800.
- Mott, H. R., Carpenter, J. W., and Campbell, S. L. (1997). Structural and functional analysis of a mutant Ras protein that is insensitive to nitric oxide activation. *Biochemistry* 36, 3640-3644.
- Muroya, K., Hattori, S., and Nakamura, S. (1992). Nerve growth factor induces rapid accumulation of the GTP-bound form of p21ras in rat pheochromocytoma PC12 cells. *Oncogene* 7, 277-281.
- Murphy, L. O., Smith, S., Chen, R. H., Fingar, D. C., and Blenis, J. (2002). Molecular interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products. *Nat Cell Biol* 4, 556-564.
- Murray, K. (1966). The acid extraction of histones from calf thymus deoxyribonucleoprotein. *J Mol Biol* 15, 409-419.
- Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B. A., and Yuan, J. (2000). Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 403, 98-103.

- Nakashima, S., Morinaka, K., Koyama, S., Ikeda, M., Kishida, M., Okawa, K., Iwamatsu, A., Kishida, S., and Kikuchi, A. (1999). Small G protein Ral and its downstream molecules regulate endocytosis of EGF and insulin receptors. *Embo J* 18, 3629-3642.
- Normanno, N., De Luca, A., Bianco, C., Strizzi, L., Mancino, M., Maiello, M. R., Carotenuto, A., De Feo, G., Caponigro, F., and Salomon, D. S. (2006). Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene* 366, 2-16.
- Nosjean, O., and Boutin, J. A. (2002). Natural ligands of PPARgamma: are prostaglandin J(2) derivatives really playing the part? *Cell Signal* 14, 573-583.
- Ohno, K., Sakai, T., Fukushima, M., Narumiya, S., and Fujiwara, M. (1988). Site and mechanism of growth inhibition by prostaglandins. IV. Effect of cyclopentenone prostaglandins on cell cycle progression of G1-enriched HeLa S3 cells. *J Pharmacol Exp Ther* 245, 294-298.
- Ohta, Y., Suzuki, N., Nakamura, S., Hartwig, J. H., and Stossel, T. P. (1999). The small GTPase RalA targets filamin to induce filopodia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 2122-2128.
- Oliva, J. L., Perez-Sala, D., Castrillo, A., Martinez, N., Canada, F. J., Bosca, L., and Rojas, J. M. (2003). The cyclopentenone 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 binds to and activates H-Ras. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 4772-4777.
- Oliva, J. L., Zarich, N., Martinez, N., Jorge, R., Castrillo, A., Azanedo, M., Garcia-Vargas, S., Gutierrez-Eisman, S., Juarranz, A., Bosca, L., *et al.* (2004). The P34G mutation reduces the transforming activity of K-Ras and N-Ras in NIH 3T3 cells but not of H-Ras. *J Biol Chem* 279, 33480-33491.
- Omerovic, J., Laude, A. J., and Prior, I. A. (2007). Ras proteins: paradigms for compartmentalised and isoform-specific signalling. *Cell Mol Life Sci* 64, 2575-2589.
- Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B. E., Karandikar, M., Berman, K., and Cobb, M. H. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 22, 153-183.
- Perez-Sala, D., Cernuda-Morollon, E., and Canada, F. J. (2003). Molecular basis for the direct inhibition of AP-1 DNA binding by 15-deoxy-Delta 12,14-prostaglandin J2. *J Biol Chem* 278, 51251-51260.
- Perez de Castro, I., Bivona, T. G., Philips, M. R., and Pellicer, A. (2004). Ras activation in Jurkat T cells following low-grade stimulation of the T-cell receptor is specific to N-Ras and occurs only on the Golgi apparatus. *Mol Cell Biol* 24, 3485-3496.
- Prior, I. A., Harding, A., Yan, J., Sluimer, J., Parton, R. G., and Hancock, J. F. (2001). GTP-dependent segregation of H-ras from lipid rafts is required for biological activity. *Nat Cell Biol* 3, 368-375.

- Radomski, M. W., Palmer, R. M., and Moncada, S. (1987). Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet* 2, 1057-1058.
- Repasky, G. A., Zhou, Y., Morita, S., and Der, C. J. (2007). Ras-mediated intestinal epithelial cell transformation requires cyclooxygenase-2-induced prostaglandin E2 signaling. *Mol Carcinog* 46, 958-970.
- Ricote, M., Li, A. C., Willson, T. M., Kelly, C. J., and Glass, C. K. (1998). The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 391, 79-82.
- Rocks, O., Peyker, A., Kahms, M., Verveer, P. J., Koerner, C., Lumbierres, M., Kuhlmann, J., Waldmann, H., Wittinghofer, A., and Bastiaens, P. I. (2005). An acylation cycle regulates localization and activity of palmitoylated Ras isoforms. *Science* 307, 1746-1752.
- Rojas, J. M., Santos, E. (2002). The Ras genes and human cancer: different implications and different roles. *Current Genomics* 3, 16.
- Rojas, J. M., Santos, E., ed. (2006). *Ras GEFs and Ras GAPs* (Springer).
- Rolin, S., Hanson, J., Vastersaegher, C., Cherdon, C., Pratico, D., Masereel, B., and Dogne, J. M. (2007). BM-520, an original TXA2 modulator, inhibits the action of thromboxane A2 and 8-iso-prostaglandin F2alpha in vitro and in vivo on human and rodent platelets, and aortic vascular smooth muscles from rodents. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 84, 14-23.
- Rosseland, C. M., Wierod, L., Flinder, L. I., Oksvold, M. P., Skarpen, E., and Huitfeldt, H. S. (2008). Distinct functions of H-Ras and K-Ras in proliferation and survival of primary hepatocytes due to selective activation of ERK and PI3K. *J Cell Physiol* 215, 818-826.
- Rossi, A., Elia, G., and Santoro, M. G. (1997). Inhibition of nuclear factor kappa B by prostaglandin A1: an effect associated with heat shock transcription factor activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 746-750.
- Rossi, A., Kapahi, P., Natoli, G., Takahashi, T., Chen, Y., Karin, M., and Santoro, M. G. (2000). Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of I kappa B kinase. *Nature* 403, 103-108.
- Roy, S., Plowman, S., Rotblat, B., Prior, I. A., Muncke, C., Grainger, S., Parton, R. G., Henis, Y. I., Kloog, Y., and Hancock, J. F. (2005). Individual palmitoyl residues serve distinct roles in H-ras trafficking, microlocalization, and signaling. *Mol Cell Biol* 25, 6722-6733.
- Sanchez-Molina, S., Oliva, J. L., Garcia-Vargas, S., Valls, E., Rojas, J. M., and Martinez-Balbas, M. A. (2006). The histone acetyltransferases CBP/p300 are degraded in NIH3T3 cells by activation of Ras signaling pathway. *Biochem J*.

- Santillo, M., Mondola, P., Seru, R., Annella, T., Cassano, S., Ciullo, I., Tecce, M. F., Iacomino, G., Damiano, S., Cuda, G., *et al.* (2001). Opposing functions of Ki- and Ha-Ras genes in the regulation of redox signals. *Curr Biol* 11, 614-619.
- Santoro, M. G., Benedetto, A., and Jaffe, B. M. (1979). Prostaglandin A1 induces differentiation in Friend erythroleukemia cells. *Prostaglandins* 17, 719-727.
- Santoro, M. G., Crisari, A., Benedetto, A., and Amici, C. (1986). Modulation of the growth of a human erythroleukemic cell line (K562) by prostaglandins: antiproliferative action of prostaglandin A. *Cancer Res* 46, 6073-6077.
- Sasaguri, T., Masuda, J., Shimokado, K., Yokota, T., Kosaka, C., Fujishima, M., and Ogata, J. (1992). Prostaglandins A and J arrest the cell cycle of cultured vascular smooth muscle cells without suppression of c-myc expression. *Exp Cell Res* 200, 351-357.
- Satoh, T., Endo, M., Nakafuku, M., Akiyama, T., Yamamoto, T., and Kaziro, Y. (1990). Accumulation of p21ras.GTP in response to stimulation with epidermal growth factor and oncogene products with tyrosine kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 7926-7929.
- Satoh, T., Furuta, K., Tomokiyo, K., Nakatsuka, D., Tanikawa, M., Nakanishi, M., Miura, M., Tanaka, S., Koike, T., Hatanaka, H., *et al.* (2000a). Facilitatory roles of novel compounds designed from cyclopentenone prostaglandins on neurite outgrowth-promoting activities of nerve growth factor. *J Neurochem* 75, 1092-1102.
- Satoh, T., Furuta, K., Tomokiyo, K., Suzuki, M., and Watanabe, Y. (2000b). Designed cyclopentenone prostaglandin derivatives as neurite outgrowth-promoting compounds for CAD cells, a rat catecholaminergic neuronal cell line of the central nervous system. *Neurosci Lett* 291, 167-170.
- Satoh, T., Minami, Y., Kono, T., Yamada, K., Kawahara, A., Taniguchi, T., and Kaziro, Y. (1992). Interleukin 2-induced activation of Ras requires two domains of interleukin 2 receptor beta subunit, the essential region for growth stimulation and Lck-binding domain. *J Biol Chem* 267, 25423-25427.
- Satoh, T., Nakafuku, M., Miyajima, A., and Kaziro, Y. (1991). Involvement of ras p21 protein in signal-transduction pathways from interleukin 2, interleukin 3, and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, but not from interleukin 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 3314-3318.
- Shi, Q., Bao, S., Maxwell, J. A., Reese, E. D., Friedman, H. S., Bigner, D. D., Wang, X. F., and Rich, J. N. (2004). Secreted protein acidic, rich in cysteine (SPARC), mediates cellular survival of gliomas through AKT activation. *J Biol Chem* 279, 52200-52209.

- Shih, C., Padhy, L. C., Murray, M., and Weinberg, R. A. (1981). Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts. *Nature* 290, 261-264.
- Slee, E. A., Adrain, C., and Martin, S. J. (2001). Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem* 276, 7320-7326.
- Spaargaren, M., and Bischoff, J. R. (1994). Identification of the guanine nucleotide dissociation stimulator for Ral as a putative effector molecule of R-ras, H-ras, K-ras, and Rap. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 12609-12613.
- Straus, D. S., and Glass, C. K. (2001). Cyclopentenone prostaglandins: new insights on biological activities and cellular targets. *Med Res Rev* 21, 185-210.
- Su, Z. Z., Austin, V. N., Zimmer, S. G., and Fisher, P. B. (1993). Defining the critical gene expression changes associated with expression and suppression of the tumorigenic and metastatic phenotype in Ha-ras-transformed cloned rat embryo fibroblast cells. *Oncogene* 8, 1211-1219.
- Taylor, S. J., and Shalloway, D. (1996). Cell cycle-dependent activation of Ras. *Curr Biol* 6, 1621-1627.
- Teng, K. K., Esposito, D. K., Schwartz, G. D., Lander, H. M., and Hempstead, B. L. (1999). Activation of c-Ha-Ras by nitric oxide modulates survival responsiveness in neuronal PC12 cells. *J Biol Chem* 274, 37315-37320.
- Thun, M. J., Henley, S. J., and Gansler, T. (2004). Inflammation and cancer: an epidemiological perspective. *Novartis Found Symp* 256, 6-21; discussion 22-28, 49-52, 266-269.
- Tian, T., Harding, A., Inder, K., Plowman, S., Parton, R. G., and Hancock, J. F. (2007). Plasma membrane nanoswitches generate high-fidelity Ras signal transduction. *Nat Cell Biol* 9, 905-914.
- Tonge, D., Chan, K., Zhu, N., Panjwani, A., Arno, M., Lynham, S., Ward, M., Snape, A., and Pizzey, J. (2008). Enhancement of axonal regeneration by in vitro conditioning and its inhibition by cyclopentenone prostaglandins. *J Cell Sci* 121, 2565-2577.
- Umanoff, H., Edelmann, W., Pellicer, A., and Kucherlapati, R. (1995). The murine N-ras gene is not essential for growth and development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 1709-1713.
- Vaudry, D., Stork, P. J., Lazarovici, P., and Eiden, L. E. (2002). Signaling pathways for PC12 cell differentiation: making the right connections. *Science* 296, 1648-1649.
- Vavvas, D., Li, X., Avruch, J., and Zhang, X. F. (1998). Identification of Nore1 as a potential Ras effector. *J Biol Chem* 273, 5439-5442.

- Vera, G., Alvina, M., Pak, N., Sola, J. C., Diaz, C., and Araya, H. (1996). [Effect of energy density and fat level of milk formulas on subsequent food and energy intake in preschool children]. *Arch Latinoam Nutr* 46, 210-215.
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., and Reutelingsperger, C. (1995). A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 184, 39-51.
- Voice, J. K., Klemke, R. L., Le, A., and Jackson, J. H. (1999). Four human ras homologs differ in their abilities to activate Raf-1, induce transformation, and stimulate cell motility. *J Biol Chem* 274, 17164-17170.
- Waldman, S. A., and Murad, F. (1987). Cyclic GMP synthesis and function. *Pharmacol Rev* 39, 163-196.
- Walsh, A. B., and Bar-Sagi, D. (2001). Differential activation of the Rac pathway by Ha-Ras and K-Ras. *J Biol Chem* 276, 15609-15615.
- Wang, D., Buchanan, F. G., Wang, H., Dey, S. K., and DuBois, R. N. (2005). Prostaglandin E2 enhances intestinal adenoma growth via activation of the Ras-mitogen-activated protein kinase cascade. *Cancer Res* 65, 1822-1829.
- Wang, X., Simeoni, L., Lindquist, J. A., Saez-Rodriguez, J., Ambach, A., Gilles, E. D., Kliche, S., and Schraven, B. (2008). Dynamics of proximal signaling events after TCR/CD8-mediated induction of proliferation or apoptosis in mature CD8+ T cells. *J Immunol* 180, 6703-6712.
- Warren, C. M., and Landgraf, R. (2006). Signaling through ERBB receptors: multiple layers of diversity and control. *Cell Signal* 18, 923-933.
- Waskiewicz, A. J., Flynn, A., Proud, C. G., and Cooper, J. A. (1997). Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. *Embo J* 16, 1909-1920.
- Wendel, H. G., De Stanchina, E., Fridman, J. S., Malina, A., Ray, S., Kogan, S., Cordon-Cardo, C., Pelletier, J., and Lowe, S. W. (2004). Survival signalling by Akt and eIF4E in oncogenesis and cancer therapy. *Nature* 428, 332-337.
- Willumsen, B. M., Christensen, A., Hubbert, N. L., Papageorge, A. G., and Lowy, D. R. (1984). The p21 ras C-terminus is required for transformation and membrane association. *Nature* 310, 583-586.
- Wittinghofer, A., and Pai, E. F. (1991). The structure of Ras protein: a model for a universal molecular switch. *Trends Biochem Sci* 16, 382-387.
- Wittinghofer, F., Krenzel, U., John, J., Kabsch, W., and Pai, E. F. (1991). Three-dimensional structure of p21 in the active conformation and analysis of an oncogenic mutant. *Environ Health Perspect* 93, 11-15.

- Wolthuis, R. M., Zwartkruis, F., Moen, T. C., and Bos, J. L. (1998). Ras-dependent activation of the small GTPase Ral. *Curr Biol* 8, 471-474.
- Wright, L. P., and Philips, M. R. (2006). Thematic review series: lipid posttranslational modifications. CAAX modification and membrane targeting of Ras. *J Lipid Res* 47, 883-891.
- Wyllie, A. H., Kerr, J. F., and Currie, A. R. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68, 251-306.
- Xu, W. M., and Liu, L. Z. (1998). Nitric oxide: from a mysterious labile factor to the molecule of the Nobel Prize. Recent progress in nitric oxide research. *Cell Res* 8, 251-258.
- Xu, X. H., Hua, Y. N., Zhang, H. L., Wu, J. C., Miao, Y. Z., Han, R., Gu, Z. L., and Qin, Z. H. (2007). Greater stress protein expression enhanced by combined prostaglandin A1 and lithium in a rat model of focal ischemia. *Acta Pharmacol Sin* 28, 1097-1104.
- Yan, J., Roy, S., Apolloni, A., Lane, A., and Hancock, J. F. (1998). Ras isoforms vary in their ability to activate Raf-1 and phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem* 273, 24052-24056.
- Yu, K., Bayona, W., Kallen, C. B., Harding, H. P., Ravera, C. P., McMahon, G., Brown, M., and Lazar, M. A. (1995). Differential activation of peroxisome proliferator-activated receptors by eicosanoids. *J Biol Chem* 270, 23975-23983.
- Zabrenetzky, V., Harris, C. C., Steeg, P. S., and Roberts, D. D. (1994). Expression of the extracellular matrix molecule thrombospondin inversely correlates with malignant progression in melanoma, lung and breast carcinoma cell lines. *Int J Cancer* 59, 191-195.
- Zarich, N., Oliva, J. L., Jorge, R., Santos, E., and Rojas, J. M. (2000). The isoform-specific stretch of hSos1 defines a new Grb2-binding domain. *Oncogene* 19, 5872-5883.
- Zhang, H. L., Gu, Z. L., Savitz, S. I., Han, F., Fukunaga, K., and Qin, Z. H. (2008). Neuroprotective effects of prostaglandin A(1) in rat models of permanent focal cerebral ischemia are associated with nuclear factor-kappaB inhibition and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma up-regulation. *J Neurosci Res* 86, 1132-1141.
- Zohar, M., Teramoto, H., Katz, B. Z., Yamada, K. M., and Gutkind, J. S. (1998). Effector domain mutants of Rho dissociate cytoskeletal changes from nuclear signaling and cellular transformation. *Oncogene* 17, 991-998.

APÉNDICES

Parte de los resultados de esta tesis se han publicado en el siguiente artículo:

"Modification and Activation of Ras Proteins by Electrophilic Prostanoids with
Different Structure are Site-Selective"

Marta Renedo, Javier Gayarre, Carlota A. Garcia-Dominguez, Andrea Pérez-
Rodríguez, Alicia Prieto, F. Javier Cañada, José M. Rojas, Dolores Pérez-Sala

Biochemistry 2007, 46, 6607-6616

Publicación relacionada con el tema de esta tesis:

“Endothelial nitric oxide synthase regulates N-Ras activation on the Golgi complex of antigen-Stimulated T cells”

Sales Ibiza, Andrea Pérez-Rodríguez, Ángel Ortega, Antonio Martínez-Ruiz, Olga Barreiro, Carlota A. García-Domínguez, Víctor M. Víctor, Juan V. Esplugues, José M. Rojas, Francisco Sánchez-Madrid, Juan M. Serrador

PNAS, vol 105, nº30, 10507-10512